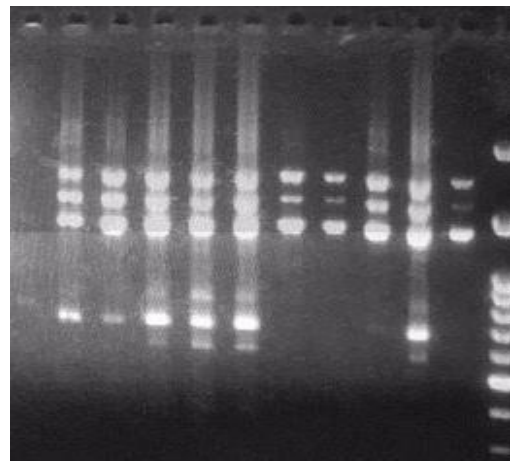


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΓΕΩΡΓΙΑ, ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ & ΓΕΩΡΓΙΚΟΣ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ & ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

"Μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας σε αυτοφυείς πληθυσμούς του φυτικού είδους *Cicer graecum* με χρήση μοριακών δεικτών ISSR. "



ΕΥΘΑΛΙΑ Ε. ΣΤΑΘΗ

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ελένη Τάνη

Αθήνα, 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΓΕΩΡΓΙΑ,ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ & ΓΕΩΡΓΙΚΟΣ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ & ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

"Μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας σε αυτοφυείς πληθυσμούς του φυτικού είδους *Cicer graecum* με χρήση μοριακών δεικτών ISSR. "

ΕΥΘΑΛΙΑ Ε. ΣΤΑΘΗ

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ελένη Τάνη

Αθήνα, 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΓΕΩΡΓΙΑ,ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ & ΓΕΩΡΓΙΚΟΣ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ & ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

"Μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας σε αυτοφυείς πληθυσμούς του φυτικού είδους *Cicer graecum* με χρήση μοριακών δεικτών ISSR. "

ΕΥΘΑΛΙΑ Ε. ΣΤΑΘΗ

Τριμελής Συμβουλευτική - Εξεταστική Επιτροπή:

Τάνη Ελένη. Λέκτορας (εισηγήτρια-επιβλέπουσα)

Μπεμπέλη Πηνελόπη. Καθηγήτρια (μέλος)

Τρίγκας Παναγιώτης. Αναπληρωτής καθηγητής (μέλος)

Αθήνα, 2018

«Η έγκριση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής από τη Σχολή Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών & Περιβάλλοντος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως» (Ν. 5343/1932 άρθρο 202, παρ. 2)

Ημερομηνία δημόσιας προφορικής παρουσίασης: 8 Νοεμβρίου 2018.

Στην Έρη μου,

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γνώση της γενετικής παραλλακτικότητας των άγριων συγγενικών ειδών *Cicer* είναι πρωταρχικής σημασίας στην επιλογή γονοτύπων στη βελτίωση του καλλιεργούμενου ρεβιθιού *Cicer arietinum*, στην αποτελεσματική διαχείριση του γενετικού υλικού και στη χαρτογράφηση του. Άγριοι συγγενείς του *C. arietinum* φαίνεται να αποτελούν ελπιδοφόρες γενετικές δεξαμενές προς εκμετάλλευσή τους από τους βελτιωτές. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση και η σύγκριση της γενετικής δομής και παραλλακτικότητας 5 αυτοφυών πληθυσμών του σπάνιου ενδημικού είδους *Cicer graecum* με χρήση 7 κυρίαρχων μοριακών δεικτών ISSR, ενώ δυνητικά θα υποβοηθήσει στη δημιουργία πρακτικών διαχείρισης και διατήρησης του γενετικού υλικού του άγριου συγγενικού είδους *C. graecum*. Στη μοριακή αυτή μελέτη ενισχύθηκαν 145 διαφορετικές ISSR ζώνες από τους 7 επιλεγμένους εκκινητές με μέσο ποσοστό πολυμορφισμού 64,28%. Ο αριθμός των διαφορετικών αλληλομόρφων (Na) και ο δραστικός αριθμός των αλληλομόρφων ανά γενετική θέση (Ne) κυμάνθηκαν σε παρόμοια επίπεδα για όλους τους πληθυσμούς. Η γενετική παραλλακτικότητα κάθε πληθυσμού εκφράστηκε ως δείκτης ετεροζυγωτίας (h) και πραγματικής ετεροζυγωτίας (uh) οι οποίοι ήταν υψηλότεροι στον 4^ο μελετώμενο πληθυσμό. Από την ανάλυση AMOVA προέκυψε ότι 65% της συνολικής γενετικής παραλλακτικότητας αποδίδεται εντός, ενώ το 35% μεταξύ των πληθυσμών. Αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα του δείκτη Shannon (I) και του συντελεστή γενετικής ποικιλότητας του Nei (GD). Επίσης, η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCoA) απεικόνισε 4 μεγάλες ομάδες για τα 97 δείγματα που μελετήθηκαν αντιστοιχώντας τα στις περιοχές συλλογής των πληθυσμών. Συμπερασματικά, πραγματοποιήθηκε μια ικανοποιητική μοριακή προσέγγιση του γονιδιώματος του αυτοφυούς άγριου είδους *C. graecum*. Ωστόσο, πληρέστερη εικόνα του γονιδιώματος αυτού πρέπει να ληφθεί σε συνδυασμό με αποτελέσματα ανάλυσής του με άλλα είδη μοριακών, βιοχημικών ή μορφολογικών δεικτών.

ABSTRACT

The knowledge of genetic variation of *Cicer* wild relatives is of primary importance in choosing genotypes in cultivated *Cicer arietinum* breeding, in the effective management of genetic material and its mapping. Wild relatives of *Cicer arietinum* appear to be promising gene pools to be exploited by the enhancers. The aim of this study is to evaluate and compare the genetic structure and variation of 5 native populations of the rare endemic *Cicer graecum* using 7 dominant ISSR molecular markers, while potentially may assist in the creation of management and conservation practices of wild *C. graecum* species genetic material. In this molecular study, 145 different ISSR bands were amplified by the 7 selected primers with an average polymorphism rate of 64.28%. The number of different alleles (N_a) and the effective number of alleles per genetic position (N_e) ranged to similar levels for all populations. The genetic variation of each population was expressed as heterozygosity (h) and unbiased heterozygosity (u_h) which was higher in the 4th population studied. AMOVA analysis showed that 65% of total genetic variation is attributed within, while 35% among populations. This is in agreement with the results of Shannon (I) and Nei (GD) genetic diversity coefficients. The principal component analysis (PCoA) also showed 4 large groups for the 97 samples studied, corresponding to the collection areas of the populations. In conclusion, a satisfactory molecular approach was conducted to the genome of the native wild *C. graecum* species. However, a fuller view of this genome must be obtained in combination with its results from other molecular, biochemical or morphological markers.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, εκφράζω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στη λέκτορα κ. Τάνη Ελένη του Εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών & Γεωργικού Πειραματισμού Γ.Π.Α., εισηγήτρια του θέματός μου, τόσο για την προθυμία ανάθεσης και επίβλεψης της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης, όσο και για την πολύτιμη επιστημονική της βοήθεια στη διόρθωση και την τελική παρουσίαση της.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Τρίγκα Παναγιώτη του Εργαστηρίου Συστηματικής Βοτανικής Γ.Π.Α., για την παραχώρηση του προς μελέτη φυτικού υλικού, για τις χρήσιμες πληροφορίες και τις εύστοχες παρατηρήσεις του στη συγγραφή της μελέτης και για την αποδοχή συμμετοχής του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μπεμπέλη Πηνελόπη, Καθηγήτρια και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών & Γεωργικού Πειραματισμού Γ.Π.Α. για τη συμμετοχή της στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και τη στήριξή της στη διεξαγωγή της μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω να εκφράσω στον ερευνητή Γανόπουλο Ιωάννη, για την πολύτιμη βοήθειά του στην επεξεργασία και ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτής της μελέτης. Επίσης, ευχαριστώ την κ. Αβραάμ Ελένη για την καθοδήγησή της στην αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων και το λοιπό εργαστηριακό προσωπικό για την προσφορά του κατά τη διεξαγωγή του πειράματος.

Τις θερμότερες μου ευχαριστίες εκφράζω στον κ. Παπασωτηρόπουλο Βασίλειο για την ευγενική παροχή ορισμένων υλικών στην πειραματική διαδικασία και για την επιστημονική του καθοδήγηση στην επίλυση τεχνικών δυσκολιών του πειράματος.

Τέλος, οφείλω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στους γονείς μου για τη συνολική ανιδιοτελή υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ευθαλία Στάθη

Αθήνα, 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT	7
ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ & ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ	12
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1 Το γένος <i>Cicer</i> : γενικά στοιχεία και ταξινόμηση	14
1.2 Φυτογεωγραφία του γένους <i>Cicer</i>	15
1.3 Ποικιλότητα	16
1.4 Γενετική και βελτίωση στο γένος <i>Cicer</i>	18
1.5 Συμβολή των άγριων συγγενικών ειδών στη βελτίωσή του <i>C. arietinum</i>	20
1.6 Τράπεζες γενετικού υλικού άγριων συγγενικών ειδών του <i>Cicer</i>	22
1.7 <i>Cicer graecum</i>	23
Κατάσταση διατήρησης	23
Περιγραφή	23
Εξάπλωση	23
Ενδιαιτήματα-οικολογία	23
Μέτρα οικολογικής διατήρησης	24
Βιολογική-δυναμική αξία.....	24
1.8 Μοριακή βελτίωση-μοριακοί δείκτες.....	24
1.8.1 Γενικά	24
1.8.2 Χαρακτηριστικά και εφαρμογές μοριακών δεικτών	26
1.9 Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR) - Τεχνική ανάλυσης μοριακών δεικτών	27
1.10 Μοριακοί δείκτες	29
1.10.1 Τεχνικές μη βασιζόμενες στην PCR.....	29
1.10.1.1 Πολυμορφισμός Μήκους Θραυσμάτων εκ Περιορισμού (RFLPs).....	29
1.10.2 Τεχνικές βασιζόμενες στην PCR	29
1.10.2 .1 Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά ΤμήματαDNA (RAPD's).....	29
1.10.2.2 Πολλαπλασιασμός Πολυμορφικών Τμημάτων DNA εκ Περιορισμού (AFLPs).....	30
1.10.2.3 Μικροδορυφόροι ή Απλές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες (SSRs)	30
1.10.2.4 Μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)	31

1.10.2.5 Αλληλουχίες στοχευόμενες στο κωδικόνιο έναρξης SCOT	31
1.10.2.6 Ενδιάμεσες απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (ISSRs)	32
Σκοπός της μελέτης	35
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
2.1 Φυτικό υλικό	36
2.2 Εξαγωγή DNA από τον ιστό	37
2.3 Φωτομέτρηση και ποσοτικός-ποιοτικός προσδιορισμός DNA	38
2.4 Καθαρισμός απομονωμένου DNA.....	40
2.5 Δοκιμαστικά-προκαταρκτικά πειράματα επιλογής συνθηκών PCR και εκκινητών	41
2.6 Ανάλυση γενετικής παραλλακτικότητας με χρήση μοριακών δεικτών ISSR.....	41
2.6.1 Χρησιμοποιούμενοι εκκινητές	41
2.6.2 Πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR για ISSR.....	42
2.6.3 Πρωτοκόλλο PCR για ISSR	43
2.6.4 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR	44
2.6.5 Υπολογισμός μεγέθους ενισχυμένης ζώνης	45
2.6.6 Καταγραφή δεδομένων	46
2.7 Μοριακή στατιστική ανάλυση.....	47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	48
3.1 Αριθμητικά αποτελέσματα φωτομέτρησης και ποσοτικού-ποιοτικού προσδιορισμού DNA.....	48
3.2 Πολυμορφισμός ISSR εκκινητών	48
3.3 Γενετική παραλλακτικότητα εντός των πληθυσμών	49
3.4 Γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών	51
4. Συζήτηση	57
4.1 Γενετική παραλλακτικότητα εντός των πληθυσμών	57
4.2 Γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών	58
4.3 Γενικά συμπεράσματα, προτάσεις & χρησιμότητα	61
5. Τελικά συμπεράσματα.....	65
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	68
1. CTAB extraction buffer.....	68
2. SEVAG	68
3. TE (T ₁₀ E ₁) buffer.	68

4. Διαδικασία χρήσης σπεκτοφωτόμετρου Nanodrop 1000 με το λογισμικό N.D.-1000 v.3.3.1.....	69
5. Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος 0,5 X TBE για χρήση του σε πηκτή αγαρόζης και διάλυμα ηλεκτροφόρησης.....	69
6. Υπολογιστικοί τύποι	70
7. Χαρακτηριστικές εικόνες των ενισχυμένων ζωνών DNA σε πληθυσμούς του <i>C. graecum</i> με όλους τους εκκινητές του πειράματος.....	71
8. Χαρακτηριστικές εικόνες των αυτοφυών πληθυσμών του <i>C. graecum</i> στο φυσικό περιβάλλον ανάπτυξής τους.....	73
9. Μετρήσεις καθαρότητας και ποσοτικοποίηση DNA με τη χρήση φασματοφωτόμετρου.	78
Βιβλιογραφία.....	87
Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.....	87
Ελληνόγλωσση βιβλιογραφία	97
Διαδικτυακή βιβλιογραφία	97

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ & ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ

Adenine (A) = Αδενίνη

Amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) = Πολλαπλασιασμός Πολυμορφικών Τμημάτων DNA εκ Περιορισμού

Base-pairs (bp) = ζεύγη βάσεων

Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) = Βρωμιούχο ακετυλοτριμεθυλαμμώνιο

Cytosine (C) = Κυτοσίνη

Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) = τριφωσφορικά νουκλεοτίδια

Etbr = βρωμιούχο αιθίδιο

Gene Bank= Γενετική Τράπεζα Δεδομένων

Gene flow = Γονιδιακή ροή

Genetic drift = Γενετική παρέκκλιση

Guanine (G) = Γουανίνη

Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)= ενδο-επαναλαμβανόμενες απλές

Αλληλουχίες ή ενδο-μικροδορυφορικές επαναλήψεις

Ladder = Σκάλα DNA

Loci = γονιδιακός τόπος / θέση

Marker Assistant Selection (MAS) = επιλογή βοηθούμενη από μοριακούς δείκτες.

Microsatellites = μικροδορυφόροι

PCoA = Principal Coordinate Analysis = Ανάλυση κύριων συνταγμένων

Polymerase Chain Reaction (PCR) = Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Primer = εκκινήτης

Quantitative trait loci (QTLs) = γονιδιακές θέσεις ποσοτικών χαρακτήρων

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) = Τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA

Restriction Fragment Length Polymorphism (RLFP) = Πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού

Sequence Tagged Microsatellite Sites (STMS) = Τοποθεσίες με μικροστοιχεία με ετικέτα ακολουθίας

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) = Μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός

Simple Sequence Repeats (SSR) = Απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες

Thymine (T) = Θυμίνη

Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) = Μέθοδο της μη σταθμισμένης ομαδοποίησης αριθμητικών ζευγών μέσω

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το γένος *Cicer*: γενικά στοιχεία και ταξινόμηση

Το γένος *Cicer* ανήκει στην οικογένεια Fabaceae (Leguminosae) και στη φυλή (tribe) Cicereae Alef, η οποία είναι διακριτή αλλά γενετικά συγγενική με τη φυλή Fabae που περιλαμβάνει τα γένη *Lens*, *Vicia*, *Pisum* και *Lathyrus* (Schaefer et al., 2012). Το γένος *Cicer* περιλαμβάνει 43 είδη εκ των οποίων τα 9 είναι ετήσια (σε αυτά συμπεριλαμβάνεται και το καλλιεργούμενο ρεβίθι, *C. arietinum* L.), 33 πολυετή, ενώ ένα ακόμη είδος δεν έχει προσδιορισθεί πλήρως (Van der Maesen, 1987). Ο βασικός χρωμοσωματικός αριθμός στο γένος *Cicer* είναι $x = 8$, και σχεδόν όλα τα γνωστά είδη είναι διπλοειδή με $2n = 2x = 16$ χρωμοσώματα (Labdi et al., 1996).

Το γένος *Cicer* περιλαμβάνει ποώδη φυτά ή μικρούς θάμνους. Με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τη γεωγραφική εξάπλωση των ειδών, το γένος παραδοσιακά κατατάσσεται σε τέσσερις sections: sect. *Cicer* (= *Monocicer*), sect. *Chamaecicer*, sect. *Polycicer* και sect. *Acanthocicer* (Popov 1929, Van der Maesen 1987).

Το καλλιεργούμενο ρεβίθι κατάγεται από την περιοχή της σημερινής ΝΑ Τουρκίας και των γειτονικών προς αυτήν περιοχών της Συρίας. Παλαιότεροι ερευνητές αναφέρουν κι άλλα κέντρα καταγωγής, όπως την περιοχή νότια του Καυκάσου και βόρεια της Περσίας, την περιοχή της Μεσογείου και της Αιθιοπίας. Καλλιεργείται για τουλάχιστον 7000 έτη (Van der Maesen, 1972). Η παλαιότερη αναφορά σχετικά με το είδος αυτό χρονολογείται από το 5450 π.Χ. (Helbaek, 1959). Σύμφωνα με τον FAO (2010), το καλλιεργούμενο ρεβίθι (*C. arietinum* L.) είναι η τρίτη σημαντικότερη εντατική καλλιέργεια οσπρίων στον κόσμο, όσον αφορά την έκταση και την ποσότητα της παραγωγής. Τα κυριότερα κέντρα παραγωγής του αποτελούν η ινδική υπο-ήπειρος, η Δυτική Ασία και η Βόρεια Αφρική (WANA). Πρώτη χώρα σε παραγωγή είναι η Ινδία (παράγοντας το 60% της συνολικής παγκόσμιας ποσότητας), ενώ σε μεγάλη απόσταση ακολουθούν: Τουρκία, Πακιστάν, Ιράν, Μεξικό, Αιθιοπία και Αυστραλία .

Δύο βασικοί εμπορικοί τύποι του είναι ευρέως αποδεκτοί από τους βελτιωτές: ο «Kabuli» (λευκό άνθος, σπόροι μεγάλου μεγέθους με κρεμώδες χρώμα) και ο «Desi» (μωβ άνθος, σπόροι μικρού μεγέθους, γωνιώδεις και σκουρόχρωμοι). Παραδοσιακά, τύποι «Kabuli» έχουν καλλιεργηθεί στη λεκάνη της Μεσογείου, στη Μέση Ανατολή και στην κεντρική Ασία, ενώ οι τύποι «Desi» παράγονται κυρίως στην ινδική υποήπειρο, στην Ανατολική Αφρική, στη Νότια και Κεντρική Ασία, στη Νότια Αμερική και λιγότερο στη λεκάνη της Μεσογείου. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι ο τύπος «Kabuli» προήλθε από τον ινδικής προέλευσης τύπο «Desi» στη λεκάνη της Μεσογείου (Moreno & Cubero 1978, Hawtin & Singh 1980, Salimath et al. 1984, Gil & Cubero, 1993). Οι δύο αυτοί κύριοι τύποι διαφέρουν σε πολλά σημαντικά αγρονομικά χαρακτηριστικά, όπως απόδοση και ποιότητα σπόρων. Για την αξιοποίηση της παραλλακτικότητας στους δύο αυτούς τύπους, πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις Desi x Kabuli από βελτιωτές. Ωστόσο, η μεταφορά γονιδίων μεταξύ των δύο αυτών τύπων ήταν αργή (Bahl 1980, Hawting & Singh 1980, Maynez et al.

1993). Η γονιδιακή διαφοροποίηση του ρεβιθιού στους τύπους «Desi» και «Kabuli» στη διάρκεια της εξέλιξης τους καταγράφηκε επιτυχώς από τους Agrawal & Srivastava (2010) χρησιμοποιώντας RAPD μοριακούς δείκτες. Οι σπόροι του ρεβιθιού αποτελούν σημαντική ανθρώπινη τροφή και θαυμάσια πρωτεϊνούχα ζωοτροφή. Είναι θρεπτικοί, πλούσιοι σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, βιταμίνες και μέταλλα (Wang et al., 2010). Περιέχουν ένα ισορροπημένο επίπεδο αμινοξέων, ενώ αντιθρεπτικοί παράγοντες βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα σε σύγκριση με άλλα όσπρια, πχ. λαθούρι, ρόβη (Santiago et al., 2001).

1.2 Φυτογεωγραφία του γένους *Cicer*

Η γνώση της φυτογεωγραφίας μιας ομάδας ειδών συμβάλλει στην κατανόηση της εξέλιξής τους σε σχέση με τη γεωλογική ή παλαιοκλιματική ιστορία της περιοχής εξάπλωσής τους (Cracraft 1986, Avise 2000). Η προέλευση και η διαφοροποίηση του γένους *Cicer* στις περιοχές εξάπλωσής του δεν έχουν κατανοηθεί επαρκώς. Εμφανίζει τη μεγαλύτερή του ποικιλομορφία στη Δυτική και Κεντρική Ασία με επέκταση στην περιοχή της Μεσογείου (Μέση Ανατολή, Ανατολική Ευρώπη και μια απομονωμένη περιοχή στη Βόρεια Αφρική). Τα είδη των sect. *Cicer*, *Chamaecicer* και *Polycicer* εξαπλώνονται στην περιοχή της Μεσογείου, ενώ όλα τα είδη της sect. *Acanthocicer* εξαπλώνονται κυρίως στην Περσία (Ιράν), το Αφγανιστάν και την Κεντρική Ασία, όπου απουσιάζουν τα περισσότερα μέλη της sect. *Cicer* (Popov 1929, Van der Maesen 1972, 1987).

Στο γένος *Cicer*, τα περισσότερα ετήσια είδη συγκεντρώνονται σε χαμηλά υψόμετρα της Μεσογειακής λεκάνης στη Μέση Ανατολή, ενώ όλα τα ποώδη πολυετή φυτά (π.χ. *C. montbretii*, *C. graecum* και *C. isauricum*) εξαπλώνονται σε σχετικά υγρές ορεινές περιοχές. Στη Βόρεια Αφρική και τα Κανάρια Νησιά, μόνο δύο αναρριχόμενα είδη (*C. canariense* και *C. cuneatum*) βρίσκονται σε σχετικά υγρά ενδιαιτήματα. Τα ημιθαμνώδη πολυετή φυτά ή τα είδη με αγκάθια (π.χ. *C. subaphyllum*, *C. tragacanthoides*, *C. pungens*) εξαπλώνονται κυρίως σε μεγάλα υψόμετρα, ξηρές κοιλάδες ή ορεινές περιοχές του Ιράν, του Αφγανιστάν και της Κεντρικής Ασίας (Vander Maesen 1972, 1987). Το γεγονός ότι τα είδη κατέλαβαν διαφορετικά ενδιαιτήματα εγείρει ερωτήματα σχετικά με τις γεωγραφικές σχέσεις μεταξύ τους, οι απαντήσεις στα οποία θα μας επιτρέψουν να κατανοήσουμε την ιστορία διαφοροποίησης του γένους. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν λίγα εμπειρικά στοιχεία σχετικά με τα βιογεωγραφικά πρότυπα και το χρονοδιάγραμμα διαφοροποίησης στο *Cicer*. Παρόλο που έχουν διεξαχθεί πρόσφατα εντατικές μοριακές μελέτες για το γένος (Kazan & Muehlbauer 1991, Ahmad et al. 1992, Tayyar & Waines 1996, Ahmad 1999, Iruela et al. 2002, Sudupak et al. 2002, 2004, Rajesh et al. 2003, Javadi & Yamaguchi 2004b, Sethy et al. 2006), αυτές επικεντρώθηκαν σε ετήσια είδη της Μέσης Ανατολής και σε λίγα είδη από τη Δυτική έως την Κεντρική Ασία, καθιστώντας δύσκολη την αξιολόγηση των γεωγραφικών σχέσεων μεταξύ των ειδών. Δύο πρόσφατες μελέτες μοριακής συστηματικής μελέτης βασισμένες στο DNA του χλωροπλάστη (cpDNA) rnt-F (Javadi & Yamaguchi 2004a) και στο πυρηνικό ριβοσωματικό DNA (nrDNA) (Frediani & Caputo 2005),

δεν έδωσαν ευκρινή αναλυτικά αποτελέσματα μεταξύ των ειδών κυρίως από την Ευρώπη και τη Δυτική έως την Κεντρική Ασία. Αυτό υποδηλώνει ότι απαιτείται εκτενέστερη δειγματοληψία των taxa από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και πρόσθετα μοριακά χαρακτηριστικά για την επίτευξη πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων στις εξελικτικές σχέσεις εντός του γένους.

Οι Javadi et al. (2007) συμπέραναν ότι οι περιβαλλοντικές και τεκτονικές αλλαγές είναι σημαντικοί παράγοντες στη διαφοροποίηση του γένους *Cicer*, το οποίο μπορεί να προέρχεται από τη Μεσόγειο και να διαφοροποιήθηκε κυρίως κατά τη διάρκεια του Μειόκαινου και του Πλειόκαινου. Η πρόωρη διαφοροποίηση των αφρικανικών ειδών με τη γεωγραφικά διακριτή περιοχή τους παραπέμπει σε μια ευρύτερη εξάπλωση του γένους κατά το παρελθόν. Το υπο-αλπικό πολυετές είδος *C. incisum* και το εξημερωμένο είδος *C. arietinum* έχουν κοινό πρόγονο, υποδηλώνοντας ότι τα πολυετή είδη μπορούν να συμβάλλουν στην κατανόηση των εξελικτικών σχέσεων του καλλιεργούμενου *C. arietinum*.

Η αξιοπιστία στα παραδοσιακά μορφολογικά χαρακτηριστικά για την εδραίωση των σχέσεων στο *Cicer* έχει αποδειχθεί προβληματική, επειδή αυτά τα χαρακτηριστικά παρουσιάζουν ομοπλασία (Javadi & Yamaguchi 2004a).

Η στενή γενετική βάση του καλλιεργούμενου ρεβιθιού οφείλεται στην εξημέρωσή του σε ένα μέρος του Παλαιού Κόσμου που στη συνέχεια εξαπλώθηκε πολύ αργότερα σε άλλες περιοχές. Μερικά αρχαιολογικά ευρήματα υποστηρίζουν αυτήν την υπόθεση (Serret et al., 1997).

1.3 Ποικιλότητα

Η γενετική ποικιλομορφία, και μάλιστα το μέρος της εκείνο το οποίο κληρονομείται, είναι η ουσία της βελτίωσης των καλλιεργειών, συμβάλλει στην περιγραφή γενετικών διαφορών μεταξύ των οργανισμών, στην περιγραφή ή σήμανση συγκεκριμένων γονιδίων, στην ταυτοποίηση ποικιλιών ή γονοτύπων και στη μέτρηση εξελικτικών παραμέτρων (με την προϋπόθεση της προσαρμογής των οργανισμών σε νέα περιβάλλοντα). Παραδοσιακά, η ποικιλομορφία εξετάζεται με τη μέτρηση της παραλλακτικότητας μορφολογικών παραμέτρων, βιοχημικών παραμέτρων ή με τη χρήση μοριακών δεικτών.

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν την έκφραση μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών. Στο πεδίο αξιολογούνται τα αγρονομικά χαρακτηριστικά που έχουν νόημα στη γεωργική πράξη, τα οποία είναι αποτέλεσμα δράσης πολλαπλών γονιδίων με ταυτόχρονη επίδραση από το περιβάλλον. Οι μοριακοί δείκτες με βάση το DNA δίνουν 100% γενετικές διαφορές, χωρίς να γνωρίζουμε πάντα τι σημαίνουν αυτοί οι πολυμορφισμοί.

Μοριακοί δείκτες όπως RFLPs, RAPDs, AFLPs, ISSRs και SSLPs έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας σε πολλά είδη καλλιεργειών. Μια ποικιλία μοριακών τεχνικών έχει αναπτυχθεί για τη μέτρηση της γενετικής ποικιλότητας. Οι πιο κοινές τεχνικές χρησιμοποιούν ισοένζυμα, RFLPs και πολυάριθμες δοκιμασίες όπως RAPDs, SSRs, AFLPs και ISSRs. Οι εκτιμήσεις γενετικής ποικιλότητας πολυάριθμων ειδών καλλιεργειών έχουν διεξαχθεί είτε μόνο

με δείκτες DNA είτε σε συνδυασμό με μορφολογικές αναλύσεις (Kaga et al., 1996, Paul et al., 1997, Sharma et al., 1996, Waycott & Fort, 1994). Επίσης, η εφαρμογή περισσότερων από έναν τύπο δεικτών στους ίδιους πληθυσμούς φυτών συνιστάται περαιτέρω κατά την εξέταση γενετικών σχέσεων και τη διάκριση των γονότυπων.

Λαμβάνοντας υπόψη την αγροοικονομική σημασία του ρεβιθιού, είναι απαραίτητο να μελετηθεί η γενετική ποικιλότητα εντός και μεταξύ των ειδών *Cicer* ώστε τα δεδομένα αυτά να βοηθήσουν τους βελτιωτές να εκμεταλλευτούν τους εν λόγω γενετικούς πόρους σε βελτιωτικά προγράμματα δημιουργίας υβριδίων. Οι περισσότερες από τις μελέτες σχέσεων μεταξύ των ειδών στο *Cicer* έχουν διεξαχθεί χρησιμοποιώντας μορφολογία φυτών (Robertson et al., 1997), καρυότυπους (Ocampo et al., 1992, Tayyar et al., 1994), δεδομένα διασταυρώσεων (Ladizinsky & Adler 1976, Vairinhos & Murray 1983, Ahmad & Slinkard 1992), δείκτες αλληλοεξωμωμών (Kazan & Muehlbauer, 1991, Ahmad et al., 1992) και δείκτες RAPD (Ahmad 1999). Επιπρόσθετα, παραλλακτικότητα αλληλομόρφων όσον αφορά στο μικροδορυφορικό τόπο [(TAA)_n] (Udura et al., 1999) και στην αλληλουχία ρετρομεταπόζευξης Ty1-copia (Sant et al., 2000) έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας στο *Cicer*. Ενώ σε αυτές τις μελέτες χρησιμοποιήθηκε μερικώς το γονιδίωμα ετήσιων και πολυετών άγριων ειδών του *Cicer*, θα ήταν χρήσιμο να αξιολογηθεί συστηματικά το συνολικό γονιδίωμα συμβάλλοντας στη συλλογή περισσότερων πληροφοριών για διάφορα σημαντικά χαρακτηριστικά (Van der Maesen, 1987). Το *C. arietinum* είναι αυτογονιμοποιούμενο διπλοειδές ($2n = 2x = 16$) είδος με μεσαίου μεγέθους γονιδίωμα, περίπου 750 Mbp (Arumuganathan & Earle, 1991) που εξελίχθηκε από το άγριο προγονικό *Cicer reticulatum* μέσω επιλογής (van der Maesen, 1987). Η γενετική ποικιλότητα εντός του καλλιεργούμενου ρεβιθιού είναι ελάχιστη (Ahmad et al. 1992, Udura et al. 1993, Labdi et al. 1996), έχοντας προτρέψει διάφορους ερευνητές να πειραματιστούν με διασταυρώσεις μεταξύ παρά εντός των ειδών για ανάλυση σύνδεσης μορφολογικών και ισοενζυμικών τόπων (Gaur & Slinkard, 1990, Kazan et al., 1993) και με τη μοριακή μέθοδο RFLPs (Simon & Muehlbauer, 1997) με σκοπό να μεγιστοποιηθεί ο πολυμορφισμός στην ανάλυση σύνδεσης. Τα συμπεράσματα, επίσης, των Maged Mahmoud Abou-El-enain & Shawkat Mahmoud Ahmed (2012) συμφωνούν με προηγούμενες μοριακές μελέτες στο ότι υπάρχει στενή σχέση μεταξύ γενετικών σειρών *C. arietinum* από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, οι οποίες πιθανώς να έχουν εξελιχθεί μέσω της ίδιας μητρικής γραμμής. Ο παρατηρούμενος σχετικά υψηλότερος βαθμός πολυμορφισμού με βάση πληροφορίες από ισοένζυμα αυτής της μελέτης σε σύγκριση με εκείνα άλλων δημοσιεύσεων φαίνεται να οφείλεται στο πιο ποικιλόμορφο υλικό, το οποίο ανήκε σε διαφορετικά γονιδιώματα.

Πληροφορίες με στατιστικά στοιχεία για τις φυλογενετικές σχέσεις και τη γενετική ποικιλομορφία στα διαθέσιμα γενετικά υλικά είναι απαραίτητα για το σωστό σχεδιασμό νέων βελτιωτικών προγραμμάτων για το ρεβίθι. Δεδομένα μικροδορυφορικών δεικτών από μελέτη των Naghavi et al., (2012) έδειξαν ότι η γενετική ποικιλότητα υπήρχε κυρίως μεταξύ των τοπικών ποικιλιών *C. arietinum* και όχι μεταξύ των περιοχών που αναπτύσσονται. Αυτό είναι μια σαφής ένδειξη ότι η έκταση της ενδοπληθυσμιακής ποικιλότητας είναι υψηλή, αλλά η έκταση της

γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των πληθυσμών είναι χαμηλή ή μέτρια, καθώς η στενότητα της γενετικής βάσης είναι μία από τις κύριες αιτίες της αργής προόδου στη βελτίωση του ρεβιθιού. Μια ευρεία γενετική ποικιλότητα ιρανικής προέλευσης ρεβιθιών που βρέθηκε σε αυτή και σε άλλες μελέτες (Aghaei et al., 2000, Naghavi & Jahansouz, 2005) αποτελεί κρίσιμη συνιστώσα για τη μελλοντική επιλογή και χρήση αυτού του γενετικού υλικού σε βελτιωτικά προγράμματα.

Τα ευρήματα επίσης των Nisar et al., (2007) αποκάλυψαν σημαντική ποικιλομορφία εντός του είδους *Cicer* στην πλειοψηφία των καταχωρήσεων που αναλύθηκαν τα οποία, όμως, δε συμφωνούν με τους Mehrani (2002) και Ghafoor et al. (2003), οι οποίοι ανέφεραν χαμηλή ποικιλομορφία εντός του είδους *Cicer* για τις πρωτεΐνες του σπόρου. Η αντίφαση οφείλεται προφανώς στη χρήση διαφορετικών γενετικών υλικών τόσο από τοπικές όσο και εξωτικές πηγές στα οποία φάνηκε μερικώς γεωγραφική συσχέτιση, ενώ όλα τα γενετικά υλικά δείχνουν να προέρχεται από την ίδια αρχική πηγή.

Τέλος, η κατανόηση των προσαρμοστικών στρατηγικών στο γένος *Cicer* είναι εξαιρετική περιορισμένη, ενώ δεν είναι εφικτή η διεύρυνση της στενής γενετικής βάσης του καλλιεργούμενου ρεβιθιού με την εισαγωγή ποικιλομορφίας από τους άγριους συγγενείς. Είναι απαραίτητο να διευρυνθεί τόσο η οικογεωγραφική όσο και η γενετική ποικιλότητα της παγκόσμιας συλλογή ετήσιων άγριων ειδών *Cicer* με τη διεξαγωγή στοχευμένων συλλογών γενετικών υλικών που δεν προϋπάρχουν στις τρέχουσες συλλογές των τραπεζών.

1.4 Γενετική και βελτίωση στο γένος *Cicer*

Το *C. arietinum* πρόκειται για μια αυτογονιμοποιούμενη καλλιέργεια, με τη φυσική του σταυροεπικονίαση να κυμαίνεται μεταξύ 0-1% (Singh, 1987). Αυτή η φύση του *Cicer* και η σεξουαλική ασυμβατότητά του με τους περισσότερους άγριους γονότυπους του σε φυσικές διασταυρώσεις μεταξύ ειδών, ευθύνονται για την περιορισμένη μη συμβατική εκμετάλλευσή του στη δημιουργία υβριδίων για οικονομικά σημαντικά χαρακτηριστικών όπως: ο υψηλός αριθμός σπόρων ανά καρπό, η ανθεκτικότητα στις ασθένειες, ο πιο αποδοτικός τύπος φυτού, το σχήμα του σπόρου που οδηγεί σε μείωση της απόδοσής του (Saxena & Singh, 1987). Υπάρχουν, δηλαδή, περιορισμοί ισχυροί για τη γονιμοποίηση για την εξειδικευμένη υβριδοποίηση μεταξύ πολλών από τα άγρια είδη του γένους *Cicer* όπως και έλλειψη πλήρων δεδομένων διασταυρώσεων.

Παρά τις σημαντικές διεθνείς επενδύσεις για κλασσική βελτίωση, η παραγωγικότητα της καλλιέργειας δεν έχει ακόμη βελτιωθεί σημαντικά. Ο κύριος περιορισμός για την αύξηση της απόδοσης στην στην ινδική υπο-ήπειρο, τη Δυτική Ασία και τη Βόρεια Αφρική είναι η ευαισθησία του φυτού σε μια ασθένεια των φύλλων, που προκαλείται από την ασκομύκητα *Ascochyta rabiei* (Saxena & Singh 1987, Singh et al. 1992, Kaiser 1997), και στο φουσάριο που προκαλείται από το *Fusarium oxysporum* *nf. sp. cicero* στην ινδική υποήπειρο (Srivastava et al., 1984, Jiminéz-Díaz et al., 1993). Κατά συνέπεια, η βελτίωση του ρεβιθιού στοχεύει στη δημιουργία ποικιλιών υψηλής απόδοσης που συνδυάζουν μακροχρόνια

ανθεκτικότητα έναντι στα παθογόνα αυτά με ανθεκτικότητα στις αβιοτικές καταπονήσεις όπως: ξηρασία, κρύο.

Ο αυξανόμενος πληθυσμός της Γης καθιστά επιτακτική την ανάγκη επίσημης καταγραφής των διαθέσιμων γονότυπων στην πλειοψηφία των καλλιεργειών που χρησιμοποιούνται στην ανθρώπινη διατροφή, περιλαμβάνοντας και το ρεβίθι. Το ρεβίθι ως αυτογονιμοποιούμενη καλλιέργεια, υποτίθεται ότι θα εμφανίζει μικρή γενετική παραλλακτικότητα. Έτσι, οι σπόροι που παρουσιάζουν γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ διαφορετικών γονότυπων του *Cicer*, θα μπορούσαν να είναι ένας πρακτικός τρόπος επιλογής των προς διασταύρωση γονέων (Ahmad et al., 2010).

Παρόλο που μόνο το *C. arietinum* είναι καλλιεργούμενο είδος, διαθέτει χαμηλό επίπεδο γενετικής ποικιλότητας, στο οποίο μπορεί να οφείλεται η ευαισθησία του σε εχθρούς και ασθένειες στη γεωργική πρακτική. Από την άλλη πλευρά, το *C. reticulatum*, που θεωρείται πρόγονος του καλλιεργούμενου ρεβιθιού, είναι ανθεκτικό ή ανεκτικό σε διάφορους αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες (Haware et al., 1992, Singh et al., 1994, 1998, Collard et al., 2001, Sharma et al., 2005). Ως εκ τούτου, δύναται να χρησιμεύσει ως πηγή τέτοιων γονιδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βελτιωτικά προγράμματα του *C. arietinum*. Επομένως, υπάρχει ανάγκη καλύτερης κατανόησης των γενετικών μηχανισμών που αποτελούν τη βάση της φαινοτυπικής παραλλακτικότητας μεταξύ *C. arietinum* και *C. reticulatum*, που θα βοηθούσε στη σχεδίαση μεθόδων βελτίωσης που χρησιμοποιούν γονίδια του *C. reticulatum*. Η αλληλούχιση του γονιδιώματος ή του μεταγραφώματος καλλιεργούμενων και άγριων ειδών ρεβιθιού και η μελέτη πολυμορφισμών στις αλληλουχίες παρέχουν την ευκαιρία να κατανοήσουμε τη γενετική βάση των φαινοτύπων που σχετίζονται με τα δύο είδη, καθώς και πτυχές της εξέλιξης του γονιδιώματος εντός του *Cicer*.

Βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες μειώνουν την παγκόσμια παραγωγή ρεβιθιού, οπότε γίνεται συνεχής αναζήτηση για ελίτ γονότυπους με χρήση μοριακών δεικτών βασιζόμενων την PCR (Singh et al., 2008). Το ινδικό ερευνητικό ινστιτούτο, Kanpur, (www.iipr.res.in) διατηρεί περισσότερες από 3000 καταχωρήσεις ως πρωταρχικό γενετικό απόθεμα για το ρεβίθι. Η αξιολόγηση αυτής της γενετικής ποικιλότητας αποτελεί βασικό παράγοντα στη βελτίωση της απόδοσης των καλλιεργειών (Renganayaki et al., 2001).

Ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων απαντήθηκε σε άγρια είδη *Cicer* (Singh 1990, Singh et al., 1994) αλλά, μέχρι σήμερα, μόνο διασταυρώσεις μεταξύ *C. arietinum* με *C. reticulatum* ή *Cicer echinospermum* (Ladizinsky & Adler 1976a, b, Singh & Ocampo, 1993, 1997) έχουν επιτευχθεί. Έχει αναφερθεί ότι εξειδικευμένα υβρίδια των καλλιεργούμενων ρεβιθιών με *Cicer pinatifidum*, *Cicer judaicum* και *Cicer bijugum* είναι εφικτά (Singh et al., 1994, Badami et al., 1997). Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά δεν έχουν επιβεβαιωθεί. Για να αξιοποιηθεί η πολύτιμη γενετική παραλλακτικότητα που βρέθηκε στα άγρια τόσο, πρέπει να καταβληθεί σημαντική προσπάθεια εισαγωγής γονιδίων από τους άγριους συγγενείς στα καλλιεργούμενα είδη. (Singh 1990, Singh & Ocampo 1997)

Ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης σπόρων (Ladizinsky & Adler 1975, Vairinhos & Murray 1983, Ahmad & Slinkard, 1992) και ανάλυση ισοενζύμων (Kazán &

Muehlbauer 1991 Ahmad et al. 1992, Labdi et al. 1996, Tayyar & Wainess, 1996) έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποτύπωση γενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών *Cicer*. Αυτές οι μελέτες αποκάλυψαν ελάχιστο πολυμορφισμό εντός του είδους, ιδιαίτερα εντός του *C. arietinum*. Ωστόσο, απαιτείται διαθεσιμότητα μεγάλου αριθμού πολυμορφικών δεικτών για αποτελεσματικές γενετικές μελέτες στην ποικιλομορφία ή στην ανάλυση σύνδεσης.

Γενικά, γενετικές σχέσεις εντός του *Cicer sp.* με βάση μοριακά δεδομένα συμφωνούν με άλλους τύπους αναλύσεων που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό των σχέσεων μεταξύ των ειδών. Για παράδειγμα, αναμενόμενα αποτελέσματα με βάση την ανάλυση καρυότυπου (Ohri & Pal 1991, Ocampo et al. 1992) συμφωνούν με αυτά από διασταυρώσεις (Ladizinsky και Adler 1976 a, b, Singh & Ocampo 1993). Η ανασκόπηση των Croser et al., (2003) αναλύει την πρόοδο προς την κατανόηση των γενετικών σχέσεων ανάμεσα στα είδη *Cicer* και την εισαγωγή γονιδίων από τα άγρια είδη *Cicer* στα καλλιεργούμενα.

Σύμφωνα με τους Keneni et al., (2011) σε 15 βελτιωμένες (ως προς: απόδοση, ποιότητα σπόρου, ανθεκτικότητα έναντι ασθενειών, προσαρμοστικότητα) ποικιλίες *C. arietinum* της Αιθιοπίας γενετική πρόοδος επιτεύχθηκε τόσο στην απόδοση του καλλιεργούμενου ρεβιθιού όσο και στο μέγεθος του σπόρου του, αλλά οι βελτιωτικές προσπάθειες για αυτά τα χαρακτηριστικά είχαν ως αντίκτυπο ακούσια αυξημένη ευαισθησία σπόρων προς το σκαθάρι *Callosobruchus chinensis* με υψηλότερα επίπεδα μόλυνσης από αυτό τον εχθρό. Μελλοντικά, η βελτίωση της ποιότητας των σπόρων του ρεβιθιού, θα πρέπει να συμπεριλάβει ταυτόχρονα την ενσωμάτωση της αντοχής έναντι στο *Callosobruchus chinensis*.

Αποτελέσματα της μελέτης των Jannatabadi et al., (2013) δείχνουν ότι η έκταση της γενετικής παραλλακτικότητας τοπικών ποικιλιών ρεβιθιού από το Ιράν φαίνεται να έχει παραμείνει αρκετά σταθερή. Αυτή η σταθερότητα πιθανώς να θεωρείται ποιοτική συνάφεια, καθώς φαίνεται ότι η γενετική δεξαμενή των τοπικών αυτών ποικιλιών ήταν εμπλουτισμένη με υλικό διαφορετικό από το ντόπιο— τοπικά προσαρμοσμένο γενετικό υλικό, το οποίο οδήγησε σε διεύρυνση του γενετικού υπόβαθρου σε διάφορες περιοχές του Ιράν. Οπότε, η ταξινόμηση των γονοτύπων αυτών των ιρανικών τοπικών ποικιλιών ρεβιθιού, με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά και μοριακούς δείκτες αναμένεται να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τους ιρανούς βελτιωτές στη σχεδίαση διασταυρώσεων για χαρακτηριστικά αγρονομικού ενδιαφέροντος επιλέγοντας γονοτύπους κατάλληλης ποικιλότητας.

1.5 Συμβολή των άγριων συγγενικών ειδών στη βελτίωσή του *C. arietinum*

Οι προσπάθειες για τη βελτίωση της απόδοσης και της ποιότητας του καλλιεργούμενου ρεβιθιού (*C. arietinum L.*) περιορίζονται από τη συνεχή εξάπλωση της καλλιέργειας σε φτωχά εδάφη κι από το χαμηλό επίπεδο ενδοειδικής γενετικής ποικιλότητας. Μια σειρά γενετικών σημείων συμφόρησης, αρχής γενομένης με την περιορισμένη κατανομή του άγριου προγόνου, την ιδρυτική επίδραση που συνδέεται με την εξημέρωσή του και, τέλος, τη μετάβαση της

καλλιέργειας από χειμερινή σε θερινή, μείωσαν το επίπεδο ποικιλότητας (Berger et al., 2003).

Άγριοι συγγενείς του ρεβιθιού έχουν φανεί να αποτελούν ελπιδοφόρες πηγές γονιδίων ανθεκτικότητας έναντι σημαντικών βιοτικών και αβιοτικές καταπονήσεων παρόλο που υπάρχουν ελάχιστες διαφοροποιήσεις μεταξύ των άγριων ειδών προς εκμετάλλευσή τους από τους βελτιωτές (Singh et al., 1994).

Είναι επιτακτική αφενός η διεύρυνση της γενετικής βάσης του καλλιεργούμενου ρεβιθιού με εισαγωγή ποικιλομορφίας από το σύνολο του πρωτογενούς γενετικού υλικού κι αφετέρου η μεγιστοποίηση του υπάρχοντος δυναμικού της καλλιέργειας με την έκθεση των προσαρμοστικών στρατηγικών που επί του παρόντος καλύπτονται από μονομορφικούς γενετικούς τόπους με μια συγκριτική φυσιολογική προσέγγιση με βάση τα ετήσια άγρια είδη *Cicer*. Το άγριο γενετικό υλικό προσφέρεται σε αυτή την προσέγγιση, επειδή οι προσαρμοστικές στρατηγικές έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα από τη διαδικασία εξημέρωσης. Επιλέγοντας αντιπαραβαλλόμενους πληθυσμούς που εκπροσωπούν διαφορετικούς οικοτύπους, αποκαλύπτονται οι προσαρμοστικές στρατηγικές στο εύρος των περιβαλλόντων που αναπτύσσονται τα ετήσια άγρια είδη *Cicer*.

Οι Croser J. S. et al., (2003) ισχυρίζονται ότι αυξημένη γενετική ποικιλομορφία μπορεί να επιτευχθεί μέσω της υβριδοποίησης των καλλιεργούμενων ειδών με τους μη-βελτιωμένους «άγριους» συγγενείς από τα 43 είδη του γένους *Cicer*. Μέχρι σήμερα, τα 8 είδη που παρουσιάζουν μια κοινή ετήσια συνήθεια ανάπτυξης και ίδιο αριθμό των χρωμοσωμάτων με *C. arietinum* αποτέλεσαν το κύριο επίκεντρο των προσπαθειών επιλογής. Σε αυτά τα είδη έχουν βρεθεί μορφολογικά χαρακτηριστικά και αντοχή σε μια σειρά αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων που έχουν δυνητική αξία για τα προγράμματα βελτίωσης του ρεβιθιού. Λεπτομερής ανάλυση των πρωτεϊνών και του DNA, των καρυοτύπων και των μελετών διασταύρωσης άρχισαν να διασαφηνίζουν τις σχέσεις μεταξύ των ετήσιων ειδών *Cicer*, ενώ τα πολυετή είδη έχουν πολύ λιγότερο μελετηθεί λόγω των δυσκολιών συλλογής, διάδοσης και αξιολόγησης.

Βελτιωτές σε όλο τον κόσμο έχουν αρχίσει να ενσωματώνουν χαρακτηριστικά από άγρια είδη στην πρωταρχική γενετική μορφή του *C. arietinum* (Knights et al., 2001). Σε βελτιωτικά προγράμματα του ρεβιθιού στην Αυστραλία, η προσέγγιση αυτή εφαρμόζεται από το 1986. Το 2000, 9 από τις 36 καταχωρήσεις σε εξειδικευμένες δοκιμές περιείχαν το *C. echinospermum* στην γενεαλογία τους (E. Knights, 2001). Λόγω αυτού του ενδιαφέροντος, καθίσταται ολοένα και πιο σημαντική η ανασκόπηση της κατάστασης της παγκόσμιας συλλογής ετήσιων άγριων ειδών *Cicer*, προκειμένου να καταστεί δυνατή η αποτελεσματική εκμετάλλευση των υφιστάμενων γενετικών πόρων και να υποδειχθεί η έλλειψη γενετικού υλικού.

Η γνώση της γενετικής ποικιλομορφίας τόσο σε καλλιεργούμενα όσο και σε άγρια συγγενικά είδη *Cicer*, είναι πρωταρχικής σημασίας στην επιλογή γονοτύπων για τη βελτίωση της καλλιέργειας του ρεβιθιού, στην αποτελεσματική διαχείριση του γενετικού υλικού και στη χαρτογράφηση του. Στο Ιράν υπάρχουν πολλές πηγές τέτοιου γενετικού υλικού, όπου η ελάχιστα γνωστή ποικιλομορφία τους διευρύνθηκε

με μικροδορυφορικούς δείκτες σε μελέτη μοριακής και ταυτόχρονα γεωγραφικής διαφοροποίησης τοπικών ποικιλιών *C. arietinum* από τους Naghavi et al., (2012).

Στην έρευνα των Singh et al., (2014) ανιχνεύτηκε αξιοσημείωτος πολυμορφισμός μεταξύ των 12 βελτιωτικά καλλιεργούμενων ποικιλιών ρεβιθιού και άγριω νσυγγενών τους χρησιμοποιώντας την τεχνική RAPD και ISSR. Η γενετική ποικιλομορφία στο άγριο ετήσιο είδος *Cicer* είναι γενικά στενή. (Abbo et al., 2003) Ωστόσο, μπορεί το γενετικό αυτό υλικό να αξιοποιηθεί εποικοδομητικά σε μελέτες χαρτογράφησης και για ενσωμάτωση γονιδίων ανθεκτικότητας έναντι ασθενειών ή εντόμων σε καλλιεργούμενους γονότυπους (Jamil et al., 2010).

Δεδομένα, επίσης, των Maged Mahmoud Abou-El-enain & Shawkat Mahmoud Ahmed (2012) βασισμένα σε ισοενζυμικούς δείκτες αποκάλυψαν αξιοσημείωτη διαφοροποίηση ανάμεσα στους Αιγυπτιακής προέλευσης γονότυπους του ρεβιθιού, οι οποίοι φάνηκε να προέρχονται από ένα κοινό άγριο πρόγονο με χαμηλή γενετική ποικιλομορφία, μεγάλο μέρος τη οποίας χάθηκε κατά την εξημέρωση του *Cicer*.

1.6 Τράπεζες γενετικού υλικού άγριων συγγενικών ειδών του *Cicer*

Παρόλη τη σημαντικότητα της καλλιέργειας από την προϊστορική κιάλας εποχή, είναι πολύ μικρός ο αριθμός των στενά συνδεδεμένων άγριων ειδών *Cicer* που υπάρχουν στην παγκόσμια συλλογή, ο οποίος σύμφωνα με τους Berger et al., (2003) κυμαίνεται μόνο από 1 έως 34 ανά είδος. Οι καταχωρήσεις αυτές έχουν συλλεχθεί μόνο από ένα μικρό υποσύνολο των φυσικών ενδιαιτημάτων που κατανέμονται τα ετήσια άγρια είδη *Cicer*. Συνεπώς, μόνο ένα μικρό ποσοστό της φυσικής γενετικής ποικιλομορφίας που είναι δυνητικά διαθέσιμο στους άγριους πληθυσμούς υπάρχει σε συλλογές *ex situ*.

Η παγκόσμια συλλογή ετήσιων άγριων ειδών *Cicer* φυλάσσεται στις γενετικές τράπεζες της Συμβουλευτικής Ομάδας Διεθνούς Αγροτικής Έρευνας (CGIAR), καθώς και στις καταχωρημένες στο Διεθνές Ινστιτούτο Φυτικών Γενετικών Πόρων (IPGRI, 2001). Λόγω διαφορετικού συστήματος αναγνώρισης των καταχωρήσεων και της πρακτικής της αποθήκευσης διπλών γενετικών αντιγράφων σε διάφορες γενετικές τράπεζες για σκοπούς ασφάλειας, υπερεκτιμάται σημαντικά ο αριθμός των καταχωρήσεων στην παγκόσμια συλλογή. Παρ'όλα αυτά, υπάρχουν λιγότερες από 140 καταχωρήσεις σε οποιοδήποτε ετήσιο άγριο είδος *Cicer*.

Το Διεθνές Κέντρο Γεωργικής Έρευνας Ξηρών Περιοχών (ICARDA) στο Χαλέπι της Συρίας διατηρεί τη μεγαλύτερη ετήσια συλλογή άγριων ειδών του *Cicer* στον κόσμο με 270 καταχωρήσεις. Εκτεταμένες συλλογές των άγριων *Cicer* διατηρούνται επίσης στο Διεθνές Ινστιτούτο Ερευνών Καλλιέργειας Ημιξηρών Τροπικών (ICRISAT) στην Ινδία και στον Περιφερειακό Σταθμό Εισαγωγής (USDA) στο Pullman της Washington των ΗΠΑ. Η παγκόσμια συλλογή ετήσιων άγριων ειδών *Cicer* στο ICARDA έχει αξιολογηθεί για ανθεκτικότητα σε: ασκοχύτωση, φουζάριο, συστροφή φύλλων, έντομο *Callosobruchus chinensis* L., νηματώδη *Heterodera ciceri* Vovlas, και κρύο (Singh et al., 1994). Τα μορφοφυσιολογικά

χαρακτηριστικά των καταχωρήσεων από ετήσια άγρια είδη *Cicer* του ICARDA έχουν καταγραφεί επίσης (Robertson et al., 1995).

Συμπερασματικά, η κατανόηση των προσαρμοστικών στρατηγικών στο γένος *Cicer* είναι εξαιρετικά περιορισμένη, ενώ δεν είναι εφικτή η διεύρυνση της στενής γενετικής βάσης του καλλιεργούμενου ρεβιθιού με την εισαγωγή ποικιλομορφίας από τους άγριους συγγενείς. Είναι απαραίτητο να διευρυνθεί τόσο η οικογεωγραφική όσο και η γενετική ποικιλότητα της παγκόσμιας συλλογή ετήσιων άγριων ειδών *Cicer* με τη διεξαγωγή στοχευμένων συλλογών γενετικών υλικών που δεν προϋπάρχουν στις τρέχουσες συλλογές των τραπεζών.

1.7 *Cicer graecum*

Κατάσταση διατήρησης

Το τρωτό ενδημικό είδος *Cicer graecum* Orph. ex Boiss. (1856) της οικογένειας Fabaceae (Leguminosae) είναι σπάνιο, και έχει χαρακτηριστεί ως Τρωτό (Vulnerable). ενώ φύεται σε μικρούς πληθυσμούς στα δασικά επίπεδα των υψηλών όρων της Βόρειας Πελοποννήσου.

Περιγραφή

Πολυετές, ποώδες φυτό με αδενώδες τρίχωμα και όρθιους βλαστούς μήκους 20-50 cm. Τα κατώτερα φύλλα του παραμένουν αμετάβλητα, ενώ τα ανώτερα διαφοροποιούνται, καταλήγοντας σαν «ψαλίδια»: διαθέτουν 3-8 ζεύγη φυλλαρίων, 8-18 x 4-10 mm, επιμήκη, ελλειπτικά ή πολύ οδοντωτά. Ο μίσχος βρίσκεται ελαφρώς κατώτερα από τα φύλλα, 1-6 ανθισμένα. Ο κάλυκας καμπουριάζει ισχυρά στη βάση, έχοντας γαλαζωπό έως λευκό χρώμα και τα δόντια είναι άνισα, μακρύτερα από τη στεφάνη του άνθους (20-22 mm). Ο καρπός του (όσπριο) έχει διαστάσεις 20-30 x 7-9 mm. Οι σπόροι του είναι σχεδόν κυρτοί σφαιρικοί, διαμέτρου 4 mm. Στο παράρτημα 8 παρατίθενται χαρακτηριστικές εικόνες των αυτοφυών πληθυσμών του *C. graecum* στο φυσικό περιβάλλον ανάπτυξής τους.

Εξάπλωση

Η γεωγραφική εξάπλωση του *C. graecum* είναι περιορισμένη στα κατώτερα και μεσαία υψόμετρα των βόρειων πλαγιών των ορέων Χελμός και Ζήρεια (Κυλλήνη) στη Β Πελοπόννησο. Οι Contandriopoulos et al. (1972) θεώρησαν το *C. graecum* ως ένα από τα σπανιότερα φυτά της ελληνικής χλωρίδας, λόγω της ιδιαίτερα περιορισμένης γεωγραφικής του εξάπλωσης.

Ενδιαιτήματα-οικολογία

Αναπτύσσεται κυρίως σε ανοιχτές συστάδες δασών *Abies cephalonica* και *Pinus nigra* subsp. *nigra*, σε υψόμετρα 1000-1300 m, όπως και σε χαμηλότερα υψόμετρα (800-900 m) σε ανοιχτές συστάδες *Quercus pubescens* και *Pinus nigra*. Τα φυσικά ενδιαιτήματά του είδους είναι πιθανώς ημισκιερά ή ακόμη και πλήρως εκτεθειμένα στην ηλιακή ακτινοβολία (π.χ. καλλιέργειες αραβοσίτου, θαμνώνες,

φράχτες, ρεματιές ή ξέφωτα δασών) όπου το έδαφος είναι αρκετά βαθύ και ασβεστώδες. Περίοδος ανθοφορίας από Μάιο έως Ιούλιο.

Στην Κυλλήνη απαντάται στα δάση των *Pinus*, *Abies* και ειδικότερα σαν χαρακτηριστικό taxon της φυτοκοινωνίας μεταξύ των *Pino nigrae-Ciceretum graeci*. Επιπλέον, έχει καταγραφεί στις υπόλοιπες πλαγιές του *Quercus pubescens*, σε χαμηλότερα υψόμετρα (Dimopoulos 1993). Από το Χελμό έχει αναφερθεί ως χαρακτηριστικό taxon της φυτοκοινότητας των *Pinus halepensis-Cicer graecum*.

Μέτρα οικολογικής διατήρησης

Έως τώρα δεν έχουν εφαρμοστεί μέτρα για προστασία και διατήρηση του αυτοφυούς σπάνιου είδους *C.graecum*. Οι κυριότεροι παράγοντες που απειλούν το είδος με εξαφάνιση είναι η επέκταση της καλλιεργούμενης γης σε χαμηλότερα υψόμετρα, η βόσκηση και η διεύρυνση του οδικού δικτύου σε υψηλότερα υψόμετρα. Η επιβίωση του είδους μπορεί να διασφαλιστεί εάν τα ενδιαιτήματά του ενσωματωθούν σε μεγαλύτερες προστατευόμενες περιοχές ορθολογικής διαχείρισης, κυρίως στην Κυλλήνη στην οποία βρίσκονται διάσπαρτοι μόνο 3 μικροί πληθυσμοί του. Προς το παρόν, ωστόσο, η πιο εφικτή περίπτωση διατήρησής του είναι η κατάθεση των σπόρων του σε τράπεζα γενετικού υλικού.

Βιολογική-δυναμική αξία

Το σπάνιο είδος *C. graecum* έχει χαρακτηριστεί τόσο φυτογεωγραφικά όσο και μορφολογικά. Κοντινότερος του συγγενής είναι το είδος *Cicer floribundum* το οποίο απαντάται στη Santa Anatolia της Ιταλίας. Η συγγένεια ανάμεσα τους βασίζεται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά των φύλλων, όπως το σχήμα τους και η παρουσία χνουδιού. (Contandriopoulos et al., 1972)

1.8 Μοριακή βελτίωση-μοριακοί δείκτες

1.8.1 Γενικά

Η μοριακή βελτίωση βασίζεται στη χρήση μοριακών δεικτών συνδεδεμένων με επιθυμητές χρωμοσωμικές περιοχές. Ο Χατζόπουλος (2001) αναφέρει ότι οι μοριακοί δείκτες είναι τυχαία επιλεγμένα τμήματα DNA χωρίς άμεση επίδραση στο φαινότυπο (ουδέτεροι), δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον, αξιοποιώντας το πολυμορφισμό που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA, χωρίς αναγκαία επίπτωση στα προϊόντα που κωδικοποιούν. Επιπλέον, δεν εξαρτώνται από το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού, ενώ μπορούν να καλύψουν ολόκληρο το γονιδίωμα σε προβλεπόμενες γενετικές αποστάσεις.

Συνεπώς, κύριο πλεονέκτημα των μοριακών δεικτών συγκριτικά με τους μορφολογικούς - φαινοτυπικούς και βιοχημικούς δείκτες είναι ότι ανιχνεύουν άμεσα διαφορές στις αλληλουχίες του DNA κι όχι έμμεσα από τα προϊόντα που αυτές εκφράζουν. Έτσι εξαλείφεται η επίδραση του περιβάλλοντος που μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα (Wünsch & Hormaza, 2002)

Αναφορικά με τη συμβολή της μοριακής βελτίωσης στην κλασική βελτίωση, η χρήση δεικτών δίνει τη δυνατότητα επιλογής των υπό αξιολόγηση γονοτύπων πριν εφαρμοστούν στον αγρό, είτε πρόκειται για υλικό στο οποίο θα εφαρμοστεί επιλογή είτε πρόκειται για απογονικό έλεγχο, ώστε να αξιολογούνται μόνο φυτά και οικογένειες που φέρουν την επιθυμητή χρωμοσωμική περιοχή (π.χ. αντοχής σε κάποια ασθένεια). Η γενική αρχή της μεθόδου αυτής περιγράφεται σχηματικά στην Εικόνα 1.1.

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση μοριακών δεικτών έχει επιταχύνει τη βελτίωση των φυτών σε διάφορους τομείς, όπως: ανθεκτικότητα σε ασθένειες ή έντομα και για παράγοντες βελτίωσης ποιότητας (Melchinger, 1990). Η διαθεσιμότητα μοριακών χαρτών διευκόλυναν την υποβοηθούμενη από το δείκτη επιλογή (MAS), την κλωνοποίηση των γονιδίων ανθεκτικότητας και την χαρτογράφηση ποσοτικών γνωρισμάτων αγρονομικού ενδιαφέροντος σε πολλές καλλιέργειες (Patterson et al. 1988, Winter & Kahl 1995). Για το ρεβίθι, υπάρχει ανάγκη να αναπτυχθεί ένας τέτοιος χάρτης επαρκούς πυκνότητας για χρήση στην MAS επιλογή και κλωνοποίηση σημαντικών γονιδίων.

Η κατανόηση της γενετικής ποικιλομορφίας στις πρωτογενείς γονιδιακές δεξαμενές είναι ζωτικής σημασίας στη βελτίωση κάθε καλλιέργειας (Choudhary et al., 2013) Το ρεβίθι είναι αυτογονιμοποιούμενη καλλιέργεια με στενή γενετική βάση (Serret et al., 1997). Εστιάζοντας στο διαθέσιμο γενετικό απόθεμα του *Cicer* και στη μείωση του κόστους πειραματισμού στο πεδίο που απαιτείται στην κλασική βελτίωση, ο γονοτυπικός έλεγχος με χρήση μοριακών δεικτών βασισμένων σε PCR αποτελεί προϋπόθεση σε βελτιωτικά προγράμματα.



Εικόνα 1.1. Η ανάλυση του γονιδιώματος δίνει τη δυνατότητα διερεύνησης της ύπαρξης της επιθυμητής θέσης. Αν η ανάλυση με τον μοριακό δείκτη είναι θετική (πχ υβριδισμός) σημαίνει ότι υφίσταται η επιθυμητή χρωμοσωμική περιοχή λόγω σύνδεσης. (Παραδόσεις μεταπτυχιακού μαθήματος μοριακής βελτίωσης φυτών ΓΠΑ)

1.8.2 Χαρακτηριστικά και εφαρμογές μοριακών δεικτών

Στις γενικές επιθυμητές ιδιότητες ενός μοριακού δείκτη συμπεριλαμβάνονται η παρουσία πολυμορφισμού (σύνδεση με περιοχές που εμφανίζουν πολυμορφισμό ή αντιστοιχούν σε γονιδιακές θέσεις με πολλά αλληλόμορφα), η απλή κληρονομικότητα με υψηλό, μάλιστα, συντελεστή κληρονομικότητα, η διασπορά ή ακόμη και ισοκατανομή στο γονιδίωμα. Επίσης, επιζητείται μικρό κόστος, χωρίς αρνητικές συνέπειες στο φυτό, με εύκολη στα νεαρά στάδια αναγνώριση.

Για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σωστά οι μοριακοί δείκτες θα πρέπει να αξιολογηθούν με βάση το κόστος τους, την ευκολία εφαρμογής τους, την κάλυψη στο γονιδίωμα και την διάκριση ετεροζύγωτων που επιτυγχάνουν. Οι μοριακοί δείκτες, που είναι φαινοτυπικά ουδέτεροι και περιβαλλοντικά ανεξάρτητοι, ανιχνεύουν πολυμορφισμούς, δηλαδή διαφορές στις γενετικές πληροφορίες μεταξύ μεμονωμένων φυτών. Με την ιδιότητά τους αυτή, υπόκεινται σε γενετική ανάλυση, χαρτογραφούνται και χρησιμοποιούνται για την σήμανση γενετικών τοποθεσιών, ποιοτικών και ποσοτικών γνωρισμάτων. Έτσι, οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για τα είδη *Cicer*, μπορούν να αποτελέσουν ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της εξέλιξης του γενόματος και την κατανόηση της δομής και των παραγόντων που συμβάλλουν στη γενετική παραλλακτικότητα.

Οι μοριακοί δείκτες έχουν πολλές εφαρμογές στη βελτίωση φυτών. Χρησιμοποιώντας μοριακούς δείκτες που είναι στενά συνδεδεμένοι, ή βρίσκονται μέσα σε έναν ή περισσότερους γενετικούς τόπους ποσοτικών χαρακτήρων QTL (Quantitative trait loci) η επιλογή MAS (marker-assisted selection) γίνεται περισσότερο αποτελεσματική, επιτρέποντας την κατασκευή χαρτών πλήρους γονιδιώματος που μπορούν να ενσωματωθούν με συμβατική σύνδεση χαρτών, οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις μεθόδους βελτίωσης των φυτών (Simon & Muehlbauer, 1997). Αυτό επιβεβαιώνει το ότι η χρησιμότητα των δεικτών DNA για επιλογή υποβοηθούμενη από δείκτη (MAS) είναι η σημερινή τάση της «σύγχρονης γεωργίας».

Το κλειδί για επιτυχή βελτίωση των καλλιεργειών είναι η αξιοποίηση της υπάρχουσας γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των γενετικών υλικών (Renganayaki et al., 2001). Η ποικιλομορφία των ποσοτικών γενετικών δεικτών με σχετικά υψηλό συντελεστή κληρονομικότητας παρέχει εκτιμήσεις της γενετικής ποικιλομορφίας. Οπότε, η ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών γονότυπων θα μπορούσε να είναι μια πρακτική επιλογή των προς διασταύρωση γονέων.

Άλλη εφαρμογή αποτελεί η ενσωμάτωση γονιδίων από άγρια είδη με την βοήθεια δεικτών (marker assisted introgression). Η ανασκόπηση των Croser J. S. et al., (2003) αναλύει την πρόοδο προς την κατανόηση των γενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών *Cicer* και την εισαγωγή των γονιδίων από τα άγρια είδη *Cicer* στα καλλιεργούμενα είδη. Επίσης, οι μοριακοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας και ταξονομικών /φυλογενετικών αναλύσεων διαφορετικών φυτικών ειδών ή πληθυσμών συγκεκριμένων ειδών. Τέλος μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε μελέτες βιολογικών διεργασιών, όπως ο τρόπος αναπαραγωγής, ο διασκορπισμός της γύρης, ή των σπόρων κ.α.

1.9 Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR) - Τεχνική ανάλυσης μοριακών δεικτών

Οι μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούνται για γενετικές και εξελικτικές μελέτες, καθώς επίσης και για άλλες ερευνητικές εφαρμογές, όπως: την ταυτοποίηση ποικιλιών, τον προσδιορισμό φυλογενετικών σχέσεων και την οριοθέτηση επιθυμητών γονιδίων.

Η PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι μία βιοχημική μέθοδος ενίσχυσης μιας αλληλουχίας DNA δημιουργώντας από χιλιάδες σε εκατομμύρια αντίγραφα της συγκεκριμένης αλληλουχίας. Αναπτύχθηκε το 1983 από τον Kary Mullis ενώ είναι μία απαραίτητη τεχνική σε αρκετά ιατρικά και βιολογικά ερευνητικά εργαστήρια για μια ποικιλία εφαρμογών.

Σχεδόν όλες οι PCR εφαρμογές χρησιμοποιούν μία θερμικά σταθερή πολυμεράση όπως η *Taq* πολυμεράση, ένα ένζυμο, που αρχικά απομονώθηκε από βακτήριο *Thermus aquaticus*. Αυτή η DNA πολυμεράση συναρμολογεί μία νέα αλυσίδα DNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο ένα μονόκλωνο DNA καθώς και dNTPs, τα δομικά μόρια της νέας αλυσίδας που συντίθενται και εκκινητές ή ολιγονουκλεοτίδια που χρειάζονται για την έναρξη σύνθεσης της νέας αλυσίδας DNA.

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιούνται ρυθμιστικό διάλυμα 5x ή 10x (ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο ένζυμο), μίγμα dNTPs 10Mm (το καθένα), εκκινητές 10mM, πολυμεράση και εκμαγείο DNA. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης κυμαίνεται από 20 έως 50 μl.

Οι αντιδράσεις της PCR πραγματοποιούνται ως εξής:

Το πρώτο στάδιο που λαμβάνει χώρα είναι το στάδιο της αρχικής αποδιάταξης στο οποίο η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 94-98 °C ανάλογα με το πόσο θερμοσταθερή είναι η χρησιμοποιούμενη πολυμεράση. Εντός 1-5 λεπτών όπου διαρκεί αυτό το στάδιο γίνεται αποδιάταξη των δύο αλυσίδων DNA σπάζοντας τους δεσμούς υδρογόνου που τις συγκρατούν.

Έπειτα, αρχίζουν οι κύκλοι οι οποίοι είναι μια σειρά από 30-40 επαναλαμβανόμενες αλλαγές θερμοκρασίας. Σε κάθε κύκλο PCR η ποσότητα του παραγόμενου DNA ακολουθεί εκθετική αύξηση. Οι κύκλοι αυτοί, με τη σειρά τους, αποτελούνται από 3 στάδια:

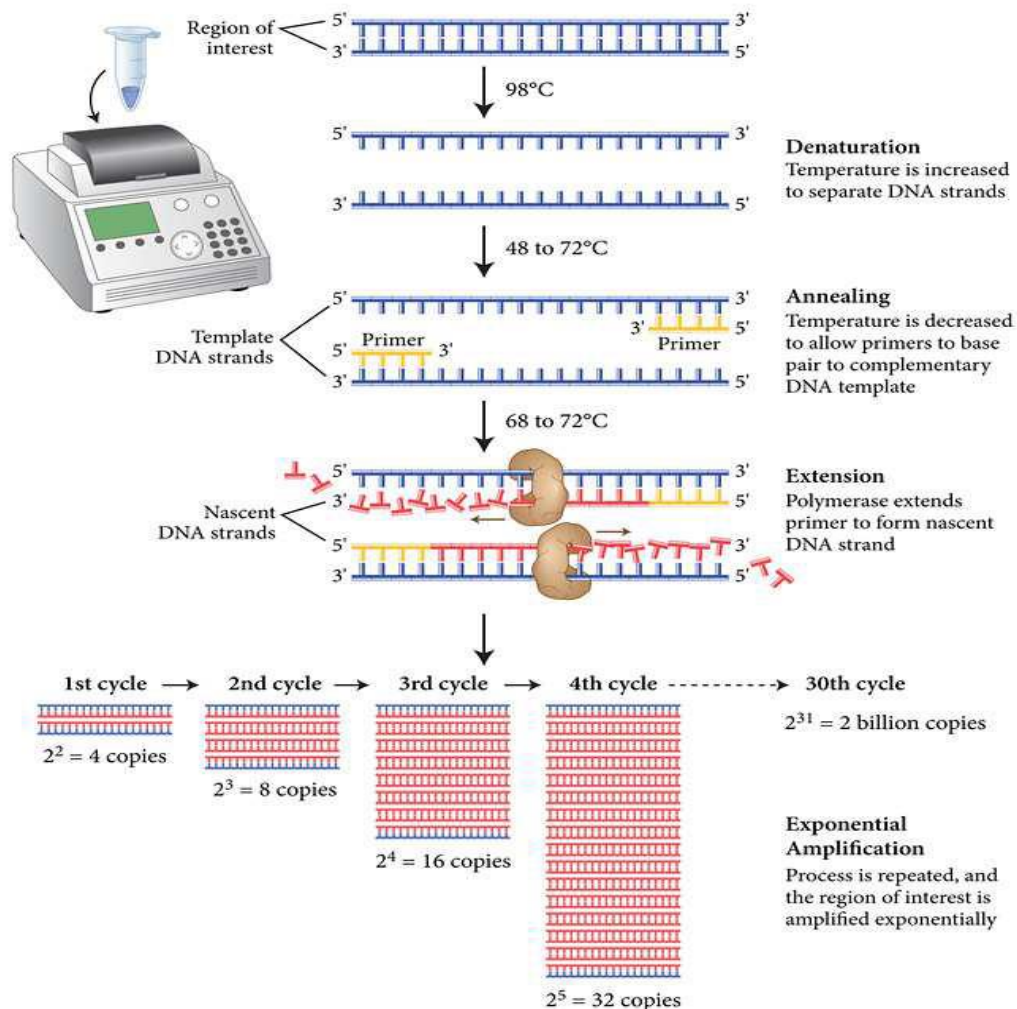
Πρώτο στάδιο είναι το στάδιο της αποδιάταξης όπου η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 94-98 °C και διαρκεί από 30-40 δευτερόλεπτα.

Δεύτερο στάδιο είναι το στάδιο της επαναδιάταξης όπου η θερμοκρασία κατεβαίνει στους 45-65 °C και διαρκεί 30-40 δευτερόλεπτα. Κατά την διάρκεια του σταδίου αυτού οι εκκινητές σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με την κάθε αλυσίδα του DNA. Η θερμοκρασία πραγματοποίησης αυτού του σταδίου εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών, κάτι που προσδιορίζεται με τη βοήθεια ειδικών υπολογιστικών προγραμμάτων. Στο συγκεκριμένο στάδιο το ένζυμο της πολυμεράσης προσδένεται στο υβρίδιο που έχουν σχηματίσει ο εκκινητής με την αλυσίδα του DNA και ξεκινά τον σχηματισμό της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA.

Τρίτο στάδιο είναι το στάδιο του πολυμερισμού της αλυσίδας του DNA. Σε αυτό το στάδιο η θερμοκρασία συνήθως ανεβαίνει στους 72 °C κάτι το οποίο εξαρτάται από τη πολυμεράση που χρησιμοποιείται. Η διάρκεια του σταδίου αυτού, επίσης, εξαρτάται από το ένζυμο πολυμεράσης. Η Phusion High Fidelity χρειάζεται 15 δευτερόλεπτα για να συνθέσει 1kb DNA ενώ η Taq χρειάζεται 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα. Σε αυτό το στάδιο η DNA πολυμεράση συνθέτει την νέα αλυσίδα DNA με εκμαγείο την αρχική, προσθέτοντας νουκλεοτίδια σε κατεύθυνση 5' προς 3'. Τελικό στάδιο είναι το στάδιο της τελικής έκτασης όπου η θερμοκρασία παραμένει στους 72 °C για 5-15 λεπτά. Σε αυτό το στάδιο κάθε εναπομείνουσα μονή αλυσίδα συμπληρώνεται από την πολυμεράση (Εικόνα 1.2).

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιούνται σε μηχανήματα που ονομάζονται θερμοκυκλοποιητές (Εικόνα 1.2).

Μετά το τέλος των αντιδράσεων τα προϊόντα PCR διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1-2% με βάση το μέγεθος τους.



Εικόνα 1.2. Θερμοκυκλοποιητής, τα στάδια της PCR και ο εκθετικός πολλαπλασιασμός του DNA στόχου. (<https://www.youtube.com/watch?v=xp04jqby5AU>)

1.10 Μοριακοί δείκτες

1.10.1 Τεχνικές μη βασιζόμενες στην PCR

1.10.1.1 Πολυμορφισμός Μήκους Θραυσμάτων εκ Περιορισμού (RFLPs)

Στην τεχνική ανάλυσης RFLPs χρησιμοποιούνται περιοριστικά ένζυμα που κόβοντας τα μόρια DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, παράγοντας έτσι θραύσματα DNA ποικίλου μεγέθους, τα οποία διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή νάιλον (Southern, 1975). Στη συνέχεια η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε συγκεκριμένα διαλύματα που περιέχουν ανιχνευτές του DNA. Η υβριδοποίηση των τμημάτων του DNA με τον ανιχνευτή ελέγχεται με βάση την σήμανση του ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής μπορεί να είναι DNA κλωνοποιημένο από κάποιο συγκεκριμένο γονίδιο, τυχαία τμήματα γενωμικού DNA ή κάποιο ολιγονουκλεοτίδιο (Χατζόπουλος, 2001).

Τα πλεονεκτήματα των δεικτών RFLPs είναι η υψηλή τους επαναληψιμότητα και η συγκυριαρχία τους. Από την άλλη όμως απαιτείται υψηλό κόστος για τις αναλύσεις, είναι χρονοβόρος διαδικασία, απαιτείται μεγάλη ποσότητα DNA και συνήθως χρησιμοποιείται ραδιενέργεια.

Λόγω χαμηλής γενετικής παραλλακτικότητας εντός του καλλιεργούμενου *C. arietinum* (Ahmad et al., 1992, Udupa et al. 1993, Labdi et al. 1996) διάφοροι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει μεθοδολογία RFLPs (Simon & Muehlbauer 1997), η οποία ήταν λιγότερο αποτελεσματική στην ανίχνευση πολυμορφισμού εξαιτίας της γενετικής ομοιογένειας του *Cicer*.

1.10.2 Τεχνικές βασιζόμενες στην PCR

Η τεχνολογία PCR έχει προωθήσει την ανάπτυξη μιας σειράς συστημάτων μοριακής ανάλυσης που ανιχνεύουν πολυμορφισμούς σε επίπεδο DNA. Οι προηγούμενοι περιορισμοί που συνδέονται με γενεαλογικά δεδομένα και μορφολογικούς, φυσιολογικούς και κυτταρολογικούς δείκτες για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας σε καλλιεργούμενα και άγρια φυτικά είδη έχουν εξαλειφθεί σε μεγάλο βαθμό από την ανάπτυξη DNA δεικτών όπως RAPDs, SSRs, AFLPs κλπ. Ωστόσο, οι δείκτες αυτοί έχουν τεχνικές διαφορές όσον αφορά το κόστος, την ταχύτητα και την απαιτούμενη ποσότητα του DNA.

1.10.2 .1 Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά Τμήματα DNA (RAPD's)

Οι δείκτες RAPD's είναι μικρά (συνήθως 10 bp), τυχαίως πολλαπλασιαζόμενα τμήματα DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, και είναι μία μέθοδος για την ανάπτυξη πολυμορφικών δεικτών (Welsh & McClelland 1990, Williams et al. 1990). Στην περίπτωση των RAPD's, ο εκκινητής προσδένεται σε διάφορες θέσεις πάνω στο δείγμα DNA δίνοντας ως αποτέλεσμα πλήθος προϊόντων. Τα προϊόντα αυτά διαχωρίζονται με βάση το μήκος τους, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και εμβάπτιση σε βρωμιούχο αιθίδιο, ενώ από τις

διαφορές στο πηκτόγραμμα διαπιστώνεται η ύπαρξη πολυμορφισμού στο γενωμικό DNA που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα στην αντίδραση PCR.

Πλεονεκτήματα των RAPD δεικτών, είναι η ευκολία, η ταχύτητα και το χαμηλό κόστος. Η ποσότητα του DNA που απαιτείται είναι μικρή, συνήθως 5-50 ng ανά αντίδραση. Επίσης, οι δείκτες αυτοί έχουν μεγάλη γενωμική αφθονία και κατανομονται τυχαία σε όλο το γονιδίωμα. Από την άλλη πλευρά όμως, σημαντικό μειονέκτημα είναι η χαμηλή επαναληψιμότητα (Schierwater & Ender, 1993).

Οι μοριακοί δείκτες RAPDs έχουν αποκαλύψει μεγαλύτερη ποικιλομορφία μεταξύ 9 ετήσιων άγριων ειδών του *Cicer* σε σχέση με τα RFLPs (Ahmad, 1999). Αποδείχθηκε ότι οι δείκτες RAPDs μπορούν να είναι χρήσιμο εργαλείο για μελέτες φυλογενετικών σχέσεων εντός του *Cicer*.

Σε μελέτη RAPD μοριακής ανάλυσης ρεβιθιών πακιστανικής προέλευσης των Ahmad et al., (2010) παρατηρήθηκε υψηλότερος βαθμός πολυμορφισμού αφενός λόγω των ποικίλων γενετικών υλικών ρεβιθιού που μελετήθηκαν κι αφετέρου στο ότι οι τυχαίοι διάσπαρτοι σε όλο το γονιδίωμα RAPDs δείκτες διαφέρουν σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο με αποτέλεσμα να παρατηρηθούν επίσης μεγάλες διαφορές για τυχαίους γενετικούς τόπους μέσα σε ένα έστω από τα γονιδιώματα που μελετήθηκαν. Ωστόσο, οι RAPDs δείκτες ήταν επαρκώς αποτελεσματικοί στην αναγνώριση των διαφορετικών αυτών γονοτύπων.

1.10.2.2 Πολλαπλασιασμός Πολυμορφικών Τμημάτων DNA εκ Περιορισμού (AFLPs)

Οι AFLPs είναι τμήματα DNA (50-800 bp) που κόπηκαν με περιοριστικά ένζυμα και πολλαπλασιάστηκαν επιλεκτικά με PCR. Οι εκκινητές της PCR αποτελούνται από μια βασική αλληλουχία, ένα περιοριστικό ένζυμο που κόβει συγκεκριμένη αλληλουχία και 1-4 εκλεκτικά νουκλεοτίδια. Τα πλεονεκτήματά τους είναι η υψηλή γενωμική τους αφθονία, η αρκετά μεγάλη επαναληψιμότητα τους, η παραγωγή πολλών και πληροφοριακών ζωνών ανά αντίδραση, το μεγάλο εύρος εφαρμογής τους, το γεγονός ότι δεν απαιτούνται δεδομένα αλληλούχησης για την κατασκευή τους και η δυνατότητα αυτοματοποιημένης ανάλυσής τους εκτός από ποσοτικό διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση. Τα μειονεκτήματά τους είναι ότι απαιτούν καθαρό, υψηλού μοριακού βάρους DNA, η κυριαρχία τους και το υψηλό τους κόστος. Σε μελέτη φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ γενών ψυχανθών των Yildizdogan et al., (2016) με AFLPs μοριακούς δείκτες, το γένος *Lens* ήταν γενετικά πιο κοντά στα γένη *Vicia* και *Lathyrus* απ' ό τι στο γένος *Cicer*.

1.10.2.3 Μικροδορυφόροι ή Απλές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες (SSRs)

Οι Απλές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες αποτελούνται από 2-5 νουκλεοτίδια, όπως (AC)_n, (ATT)_n ή (ATGT)_n, που επαναλαμβάνονται στη σειρά. Οι SSRs αναλύονται μετά από πολλαπλασιασμό με PCR μιας γενωμικής περιοχής που περιέχει την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία και διαχωρισμό των επαναλήψεων με βάση το μήκος τους σε πηκτή αгарόζης.) Η ανάλυση των δεικτών έχει πολύ υψηλή επαναληψιμότητα, λόγω μεγάλου μήκους εκκινητών στην PCR και το DNA

δεν χρειάζεται να είναι υψηλής ποιότητας. Η ταυτοποίηση κατάλληλων γονιδιακών θέσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες SSR, απαιτεί εξειδικευμένες διαδικασίες κλωνοποίησης συγκεκριμένων τμημάτων DNA και προσδιορισμό της αλληλουχίας εκατέρωθεν των άκρων ώστε να σχεδιαστούν κατάλληλοι εκκινητές αυτό αποτελεί σοβαρό μειονέκτημα της μεθόδου, γιατί απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό, αρκετό χρόνο και μεγάλο κόστος. Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των μικροδορυφόρων, όπως η παρουσία τους στο γονιδίωμα όλων των οργανισμών, το υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού τους, ο συγκυρίαρχος τρόπος κληρονομής και η δυνατότητα για αυτοματοποιημένη ανάλυσή τους, καθιστά τους μικροδορυφόρους ως άριστους μοριακούς δείκτες για εργασίες χαρτογράφησης και η μελέτη των σημειακών μεταλλάξεων.

1.10.2.4 Μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)

Είναι η θέση ενός ζευγαριού βάσεων σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία που διαφέρει από το ένα άτομο στο άλλο. Αυτή η παραλλακτικότητα συχνά εντοπίζεται σε γονίδια, γεγονός που κάνει τους δείκτες SNP πολύ χρήσιμους στην επισήμανση γονιδίων υπεύθυνων για ασθένειες, με αποτέλεσμα την ευρύτατη χρήση τους στην ιατρική. Οι δείκτες SNP είναι οι απλούστεροι συγκυρίαρχοι δείκτες που μπορεί να επισημάνουν διαφορές σε γονίδια και ο αριθμός τους είναι απεριόριστος. Ωστόσο, η ανίχνευσή τους γίνεται κυρίως με αλληλούχιση που είναι δύσκολη και ακριβή τεχνική, κάνοντας προς το παρόν τη χρήση SNP απαγορευτική για εφαρμογές ρουτίνας.

1.10.2.5 Αλληλουχίες στοχευόμενες στο κωδικόνιο έναρξης SCOT

Τα τελευταία χρόνια, πολλές νέες και εναλλακτικά υποσχόμενες τεχνικές δεικτών έχουν προκύψει. Σε συνδυασμό με την ταχεία ανάπτυξη της γονιδιωματικής έρευνας, έχει υπάρξει μια τάση απομάκρυνσης από τυχαίους δείκτες DNA προς τους δείκτες οι οποίοι στοχεύουν σε γονίδια (Andersen & Lübberstedt, 2003), (Gupta & Rustgi, 2004). Τα δεδομένα της αλληλουχίας του γονιδιώματος προσφέρουν τεράστιες δυνατότητες για την ανάπτυξη νέων δεικτών σε ποικίλα είδη φυτών (Holland, et al., 2001). Οι Collard Mackill (2009) περιγράφουν ένα νέο σύστημα μοριακού δείκτη που ονομάζεται πολυμορφισμός στοχευμένος στο κωδικόνιο έναρξης που βασίζεται στην σύντομη διατηρημένη περιοχή σε γονίδια φυτών που περιβάλλει το ATG κωδικόνιο έναρξης. Παράγονται από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας εκκινητές και μόνο που έχουν σχεδιαστεί από τη σύντομη συντηρημένη περιοχή που πλευρίζουν το κωδικόνιο έναρξης ATG που είναι διατηρημένο για όλα τα γονίδια. Ως εκ τούτου, αυτή η τεχνική είναι παρόμοια με τους RAPD ή ISSR ή αντίδραση ενισχύσεως μονού εκκινητή επειδή ένας μόνο εκκινητής χρησιμοποιείται ως πρόσθιος και αντίστροφος εκκινητή (Gupta et al. 1994, Williams et al. 1990).

Όσον αφορά το καλλιεργούμενο ρεβίθι *C. arietinum* L., μελέτη των Pakseresht et al., (2013) αναφέρει τους SCoT μοριακούς δείκτες ως πιο

πληροφοριακούς έναντι των inter simple sequence repeat (ISSR) και των directly amplified minisatellite DNA (DAMD) δεικτών για αξιολόγηση 40 γονοτύπων από τοπικές ποικιλίες που συλλέχθηκαν σε διαφορετικές γεωγραφικές τοποθεσίες του Βορειοδυτικού Ιράν. Ωστόσο, και τα 3 αυτά είδη μοριακών δεικτών είναι αποτελεσματικά στην ανίχνευση πολυμορφισμών σε γονότυπους του ρεβυθιού.

1.10.2.6 Ενδιάμεσες απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (ISSRs)

Οι ISSR βασίζονται στην ενίσχυση των τμημάτων DNA που υπάρχουν ανάμεσα σε δύο πανομοιότυπες επαναλαμβανόμενες περιοχές μικροδορυφόρων προσανατολισμένες σε αντίθετη κατεύθυνση. Η τεχνική χρησιμοποιεί μικροδορυφόρους ως εκκινητές σε μια μόνο PCR αντίδραση στοχεύοντας τις πολλαπλές θέσεις του γονιδιώματος για να ενισχύσει κυρίως την μεταξύ των απλών επαναλήψεων ακολουθία σε διαφορετικά μεγέθη. Οι επαναλήψεις των μικροδορυφόρων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές στους ISSRs μπορεί να είναι δι-, τρι-, τετρα- ή πεντα- νουκλεοτιδία. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται μπορούν να είναι είτε ακριβείς αλληλουχίες (Meyer et al. 1993, Gupta et al. 1994, Wu et al. 1994) ή συνηθέστερα να περιέχουν στο 3' ή στο 5' άκρο από 1 έως 4 εκφυλισμένες βάσεις που επεκτείνονται σε πλευρικές αλληλουχίες (Zietkiewicz et al., 1994). Οι ISSRs χρησιμοποιούν μεγαλύτερους εκκινητές (15-30μερή) σε σύγκριση με τους RAPD εκκινητές (10μερή), οι οποίοι επιτρέπουν την μετέπειτα χρήση υψηλής θερμοκρασίας επαναδιάταξης. Η θερμοκρασία επαναδιάταξης εξαρτάται από την % περιεκτικότητα GC του εκκινητή που χρησιμοποιείται και κυμαίνεται από 45-65 °C. Τα ενισχυμένα προϊόντα είναι συνήθως μεγάλα από 200-2000 bp και επιδέχονται ανίχνευση από πηκτή ηλεκτροφόρησης τόσο αгарόζης όσο και πολυακρυλαμίδης. Οι ISSRs παρουσιάζουν την ιδιαιτερότητα μικροδορυφορικών δεικτών, και δεν χρειάζεται καμία πληροφορία για τη σύνθεση της αλληλουχίας του εκκινητή απολαμβάνοντας το πλεονέκτημα των τυχαίων δεικτών (Joshi et al., 2000). Η τεχνική της σύνθεσης των εκκινητών είναι απλή, γρήγορη, χωρίς χρήση ραδιενέργειας. Οι ISSR δείκτες παρουσιάζουν συνήθως υψηλό πολυμορφισμό (Kojima et al., 1998), αν και το επίπεδο του πολυμορφισμού έχει δειχθεί να ποικίλει με τη μέθοδο ανίχνευσης που χρησιμοποιείται. Ηλεκτροφόρηση με πηκτή πολυακρυλαμίδης (PAGE) σε συνδυασμό με ραδιενέργεια φάνηκε να είναι πιο ευαίσθητη, ακολουθούμενη από PAGE με AgNO₃ χρώση και στη συνέχεια πηκτή αгарόζης με το σύστημα ανίχνευσης του βρωμιούχου αιθιδίου. Όπως οι RAPDs, η επαναληψιμότητα, το γεγονός ότι είναι κυρίαρχοι δείκτες και η ομολογία των προϊόντων ενισχύσεως είναι οι κύριοι περιορισμοί των ISSRs. Οι Fang & Roose (1997) ανέφεραν ένα επίπεδο επαναληψιμότητας άνω του 99 % ISSR δεικτών χρησιμοποιώντας δείγματα DNA της ίδιας ποικιλίας που καλλιεργούνται σε διαφορετικές περιοχές, το DNA απομονώθηκε από τα φύλλα διαφόρων ηλικιών του ίδιου ατόμου, και πραγματοποιήθηκαν χωριστές PCR. Σε άλλες περιπτώσεις, η επαναληψιμότητα της ενίσχυσης των ISSRs προϊόντων κυμαίνεται 86 - 94 %, με τη μέγιστη να είναι όταν χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με χρώση AgNO₃ και οι ασθενείς ζώνες εξαιρέθηκαν από τη βαθμολόγηση (Moreno et al., 1998). Οι ISSRs χαρακτηρίζονται ως επί το πλείστον

ως κυρίαρχοι δείκτες (Gupta et al. 1994, Tsumura et al. 1996, Ratnaparkhe et al. 1998b, Wang et al. 1998), αν και συν- κυρίαρχος διαχωρισμός έχει αναφερθεί σε ορισμένες περιπτώσεις (Wu et al. 1994, Akagi et al. 1996, Wang et al. 1998, Sankar & Moore 2001). Υπάρχει επίσης η δυνατότητα, όπως στους RAPDs, τα θραύσματα με την ίδια κινητικότητα να προέρχονται από μη ομόλογες περιοχές (Hoz et al., 1996).

Στο *C. arietinum*, οι ISSRs δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στη χαρτογράφηση γονιδίων συσχετιζόμενων με την ανθεκτικότητα στο *Fusarium*, καθώς ένας δείκτης ISSR (Ratnaparkhe et al., 1998a) αποδείχθηκε ότι βρίσκεται κοντά σε αυτό το γενετικό τόπο. Ο ίδιος δείκτης ISSR συνδέθηκε επίσης με γονίδιο ανθεκτικότητας του φυτού σε άλλη φυλή του παθογόνου (Ratnaparkhe et al., 1998b) κάτι που δείχνει στενή σύνδεση των δύο γονιδίων ανθεκτικότητας.

Οι Rao et al., (2007) αξιολόγησαν με RAPDs και ISSRs δείκτες καλλιεργούμενες ποικιλίες ρεβιθίου και τον άγριο πρόγονο *Cicer reticulatum* L., όπου η ISSR ανάλυση αποδείχθηκε πιο αξιόπιστη για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλομορφίας και για την επιλογή του επιθυμητού γενετικού υλικού σε βελτιωτικά προγράμματα. Ωστόσο, η χρησιμότητα ενός τέτοιου δείκτη ISSR στην πραγματικότητα έγκειται στη μετατροπή του σε STMS δείκτη σε επιλογή υποβοηθούμενη από δείκτη (MAS).

Στην ανασκόπηση των Bhagyawant & Srivastava (2008) αναφέρεται ότι οι δείκτες ISSR καθίστανται πληροφοριακοί ώστε να συσχετιστούν δεδομένα μοριακής ανάλυσης με αγρονομικά χαρακτηριστικά του *C. arietinum*, προϋποθέτοντας αποτελεσματική συνεργασία μεταξύ βελτιωτών και μοριακών βιολόγων για σήμανση του γονιδίου ενδιαφέροντος. Τα ήδη γνωστά γενετικά αποτυπώματα θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην εύρεση ενός δείκτη εξειδικευμένου - ικανού να αξιοποιηθεί κατά τον σχεδιασμό διασταυρώσεων στο ρεβίθι και, κατά συνέπεια, να ενισχυθεί η διαχείριση και η διατήρηση του γενετικού υλικού ρεβιθίου.

Επιπλέον, η ανάλυση ISSR-PCR έδειξε συσχέτιση με γενεαλογικά δεδομένα μεταξύ 20 καταχωρήσεων ρεβιθίου που περιελάμβανε τα είδη *C. arietinum* και *C. reticulatum* (Yadav et al., 2015).

Στην έρευνα των Singh et al., (2014) ανιχνεύτηκε αξιοσημείωτος πολυμορφισμός μεταξύ των 12 καλλιεργούμενων ποικιλιών ρεβιθίου και άγριων συγγενών τους χρησιμοποιώντας την τεχνική RAPD και ISSR. Η γενετική ποικιλομορφία στο άγριο ετήσιο είδος *Cicer* είναι γενικά στενή (Abbo et al., 2003). Ωστόσο, μπορεί το γενετικό αυτό υλικό να αξιοποιηθεί εποικοδομητικά σε μελέτες χαρτογράφησης και για ενσωμάτωση γονιδίων ανθεκτικότητας έναντι ασθενειών ή εντόμων σε καλλιεργούμενους γονότυπους. (Jamil et al., 2010).

Μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας 13 καταχωρήσεων καλλιεργούμενου και άγριου ρεβιθίου με ISSRs δείκτες από τους Gautam et al., (2016) συστήνει το τουρκικής προέλευσης *C. reticulatum* να επιλεγεί ως γονέας σε μελλοντικά βελτιωτικά προγράμματα. Όμως, είναι απαραίτητες περισσότερες προσπάθειες για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλομορφίας στο γένος *Cicer* με σκοπό τον εντοπισμό ελίτ γενετικών αποθεμάτων.

Η γενετική ποικιλομορφία και οι σχέσεις εντός και μεταξύ των μελών της πρωτογενούς γονιδιακής δεξαμενής του ρεβιθιού, συμπεριλαμβανομένων 38 καταχωρήσεων του *C. arietinum*, 6 του *C. reticulatum* και 4 των *C. echinospermum*, διερευνήθηκαν από τους Choudhary et al. (2013) χρησιμοποιώντας 31 δείκτες ISSR, ενώ ανιχνεύτηκε μέτριος βαθμός ποικιλομορφίας ανάμεσα σε καλλιεργούμενες και άγριες καταχωρήσεις *Cicer*. Η ομαδοποίηση των καταχωρήσεων δεν ακολούθησε αυστηρά τη γεωγραφική προέλευση αλλά ήταν σε καλή συμφωνία με γενεαλογικά δεδομένα και τον τύπο των σπόρων.

Η έκταση του πολυμορφισμού που ανιχνεύτηκε στη μελέτη των Aggrawal et al., (2015) με 125 ποικιλίες ρεβιθιού ινδικής προέλευσης, είναι υψηλότερη από ό, τι έχει αναφερθεί προηγουμένως (Iruela et al. 2002, Rajesh et al. 2002, Sudupak et al. 2004, Rao et al. 2007, Tahir & Karim 2011). Αυτό μπορεί να οφείλεται στην υψηλή ικανότητα διαχωρισμού των χρησιμοποιούμενων εκκινητών ISSR. Δεδομένου ότι το ρεβίθι έχει μικρή γενετική ποικιλότητα λόγω υποχρεωτικής αυτοεπικονίασης και εκτενώς μονότονου γονιδιώματος, ήταν απαραίτητο να δοκιμαστούν πολλοί δείκτες ISSR για την ανίχνευση επαρκούς πολυμορφισμού. Είναι αποτελεσματικοί λόγω της ικανότητάς τους να εκθέτουν ποικίλους γενετικούς τόπους από μία απλή ενίσχυση. Η μελέτη μιας τόσο μεγάλης συλλογής παρείχε καλύτερη γνώση της γενετικής ποικιλότητας ανάμεσα στις ποικιλίες ρεβιθιού, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για σήμανση γονιδίων.

Σκοπός της μελέτης

Με δεδομένη τη σημασία του συστηματικού χαρακτηρισμού των εγχώριων φυτογενετικών πόρων, που αναμένεται να οδηγήσει σε αποτελεσματικότερη διαχείριση του γενετικού υλικού, στο πείραμα αυτό έγινε μια μοριακή προσέγγιση του γενετικού προφίλ του αυτοφυούς φυτικού είδους *C. graecum* με δείκτες ISSR στους 5 φυσικούς πληθυσμούς του, χωρίς να μελετηθεί κάποιο συγκεκριμένο γονίδιο διότι έως τώρα δεν έχουν εντοπιστεί γονιδιακές θέσεις ενδιαφέροντος του είδους ούτε έχει χαρτογραφηθεί το γονιδίωμά του.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

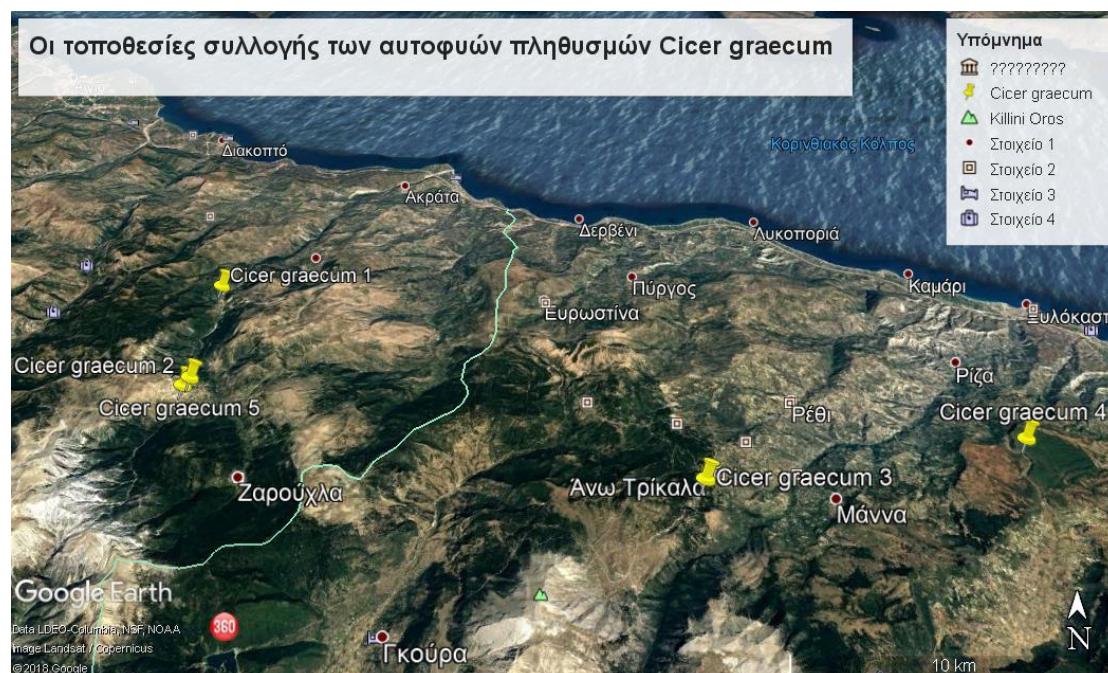
2.1 Φυτικό υλικό

Για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ως φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 97 δείγματα από πέντε εγχώριους πληθυσμούς του σπάνιου ενδημικού είδους *C. graecum* οικ. Fabaceae, οι οποίοι προήλθαν από συλλογή στις αντίστοιχες περιοχές της ορεινής Κορινθίας στις 18/06/2016 (Πίνακας 2.1, Χάρτης 2.1).

Πίνακας 2.1. Το φυτικό πειραματικό υλικό που μελετήθηκε.

ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
1	Λίμνη Τσιβλού	21
2	Περιστερά	20
3	Φλαμπουρίτσα	20
4	Δρυοδάσος Μονγκόστου	16
5	Άνω Μεσορρούγι	20

Χάρτης 2.1. Οι τοποθεσίες συλλογής των πέντε φυσικών πληθυσμών του μελετώμενου είδους *C. graecum* (Λήψη από το λογισμικό Google Earth).



Το φυτικό πειραματικό υλικό ήταν φυλαγμένο σε μαρκαρισμένα, αριθμημένα-κωδικοποιημένα σακουλάκια σε μακράς διάρκειας κατάψυξη $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Προσέχουμε έτσι ώστε να μην αποψύχουμε άσκοπα τα φυτικά δείγματα και η μεταφορά τους στο υγρό ctab buffer (πάρνημα 1) $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ που χρησιμοποιούμε στην απομόνωση DNA καλό είναι να γίνεται γρήγορα ώστε αυτό να δράσει αποτελεσματικά.



Εικόνα 2.1. Άμεση συγκομιδή και πολυτοποίηση φρέσκου φυτικού ιστού.

2.2 Εξαγωγή DNA από τον ιστό

Οι φυτικοί ιστοί ανάλογα με το αναπτυξιακό τους στάδιο περιέχουν εκτός από DNA, ένα σύνολο βιομοριών όπως RNA, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, χρωστικές κλπ, τα οποία πρέπει να απομακρυνθούν ώστε να ληφθεί καθαρό DNA, κατάλληλο για τις αντιδράσεις *pcr*.

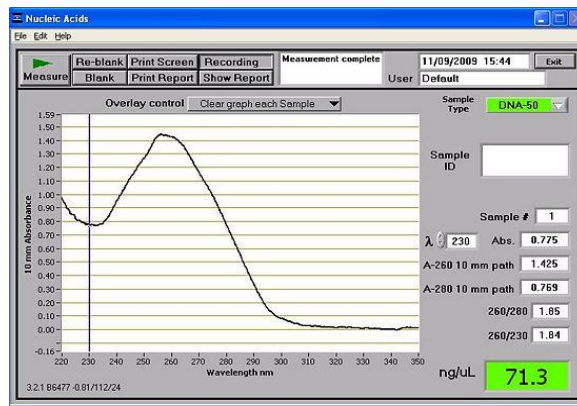
Στο παρόν πείραμα, ακολουθήθηκε η χημική διαδικασία εξαγωγής DNA από το φυτικό ιστό με CTAB (Doyle & Doyle, 1987), τα βήματα της οποίας περιγράφονται με σειρά ακριβώς παρακάτω. Σημειωτέον είναι ότι έγιναν μικρές τροποποιήσεις της μεθόδου σε κάποια σημεία της για βελτιστοποίηση του τελικού αποτελέσματος, έπειτα από δοκιμαστικά πειράματα με 2 διαφορετικά φυτικά δείγματα.

- Προετοιμασία (καθαρισμός & αποστείρωση πάγκου και λοιπών χρησιμοποιούμενων αντικειμένων, ρύθμιση του υδατόλουτρου στους 65°C, αρίθμηση-μαρκάρισμα μικροσωληνίσκου erpendorf κάθε δείγματος).
- Προθέρμανση CTAB Buffer στους 65°C για 15 λεπτά.
- Μεταφορά φρέσκου φυτικού ιστού (2 φύλλων κάθε δείγματος) από κατάψυξη -80°C σε μικροσωληνίσκο erpendorf.
- Σε κάθε τέτοιο δείγμα προστίθενται 450 μl CTAB Buffer (παράρτημα 1). Το δείγμα πολυτοποιείται με χρήση εμβόλου ή ακρορυγίου έως ότου το διάλυμα γίνει πράσινο (Εικόνα 2.1).
- Επώαση των δειγμάτων στο υδατόλουτρο στους 65°C για 50 λεπτά. Ανακίνηση αυτών ανά 10 λεπτά για 10 φορές.

- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13000 rpm.
- Προσθήκη ίσης ποσότητας (450 μl) SEVAG (παράρτημα 2) σε κάθε δείγμα (στην απαγωγό εστία). Ανακίνηση αυτών.
- Ανάδευση αυτών για 30 λεπτά στην ειδική συσκευή. (Το βήμα αυτό μπορεί να παραλειφθεί ή να πραγματοποιηθεί για μικρότερη χρονική διάρκεια, εάν επιθυμούμε)
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13000 rpm.
- Μεταφορά της (άνω) υδατικής φάσης με πιπέτα σε νέο μικροσωληνίσκο erpendorf και προσδιορισμός του νέου όγκου κάθε δείγματος.
- Προσθήκη ποσότητας ισοπροπανόλης 0,7 του νέου όγκου. Ανάμιξη με αναστροφή του μικροσωληνίσκου erpendorf για 10 φορές.
- Επάωση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου στον πάγκο για 10 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13000 rpm.
- Αφαίρεση υπερκειμένου με απαλή-κανονική αναστροφή του μικροσωληνίσκου erpendorf προσέχοντας ώστε να μην ξεκολλήσει το pellet.
- Φυγοκέντρηση με pulse στις 13000 rpm.
- Αφαίρεση υπόλοιπου υπερκειμένου με πιπέτα.
- Προσθήκη στο pellet 500 μl EtOH 70% για διαλυτοποίησή του.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13000 rpm.
- Αφαίρεση υπερκειμένου προσέχοντας ώστε να μην ξεκολλήσει το pellet.
- Φυγοκέντρηση με pulse στις 13000 rpm.
- Αφαίρεση υπόλοιπου υπερκειμένου με πιπέτα.
- Στέγνωμα στην απαγωγό εστία για 20 λεπτά έως ότου εξαφανιστεί η μυρωδιά της αιθανόλης.
- Επαναδιάλυση σε 40 μl TE. (παράρτημα 3)
- Επάωση στον πάγκο για 10 λεπτά.
- Φωτομέτρηση στο nanodrop. (παράρτημα 4)

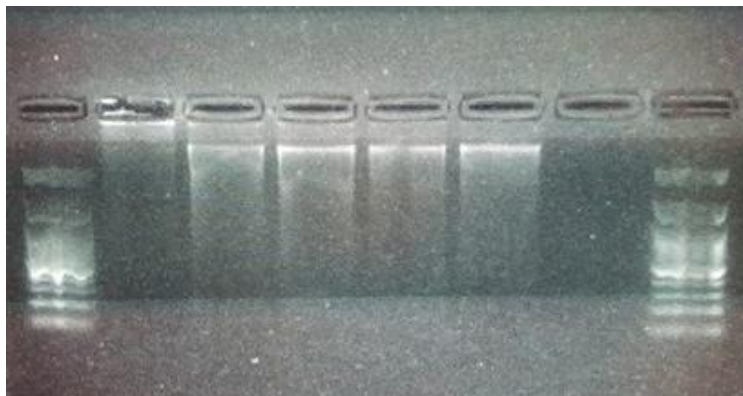
2.3 Φωτομέτρηση και ποσοτικός-ποιοτικός προσδιορισμός DNA

Για να ποσοτικοποιηθεί το ολικό DNA πραγματοποιήθηκε η φωτομέτρηση του στο ειδικό όργανο nanodrop (Εικόνα 2.2) όπου μετρήθηκε η απορρόφηση στα 260nm. Η καθαρότητα του DNA προσδιορίστηκε από τη μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm και στα 280 nm και τον λόγο των δύο μετρήσεων A_{260nm}/A_{280nm} . Για να θεωρηθούν κατάλληλα προς χρήση στα επόμενα στάδια των πειραμάτων τα ολικά γενωμικά DNAs, πρέπει ο λόγος A_{260nm}/A_{280nm} να είναι μεγαλύτερος από 1,8 και μικρότερος από 2. Αν ο λόγος είναι μικρότερος από 1,8 τότε πληροφορούμαστε ότι υπάρχει επιμόλυνση του ολικού DNA με πρωτεΐνες.

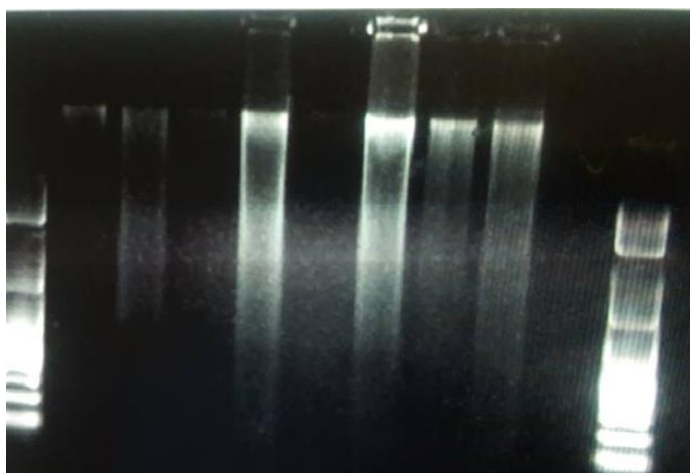


Εικόνα 2.2. α) Σπεκτοφωτόμετρο nanodrop, β) Λογισμικό του nd-1000 v.3.3.1.

Αν υπάρχει επιμόλυνση του ολικού DNA με RNA που παρασύρεται κατά την εξαγωγή δεν είναι εφικτό να αναγνωρισθεί μόνο με την χρήση του φωτόμετρου. Για να ελεγχθεί η ποιότητα του εξαγόμενου ολικού DNA αυτή επιβεβαιώνεται πάντα με σύντομης διάρκειας ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% ώστε να φανεί επίσης εάν είναι ακέραιο (Εικόνα 2.3) ή σπασμένο (smear) (Εικόνα 2.4).



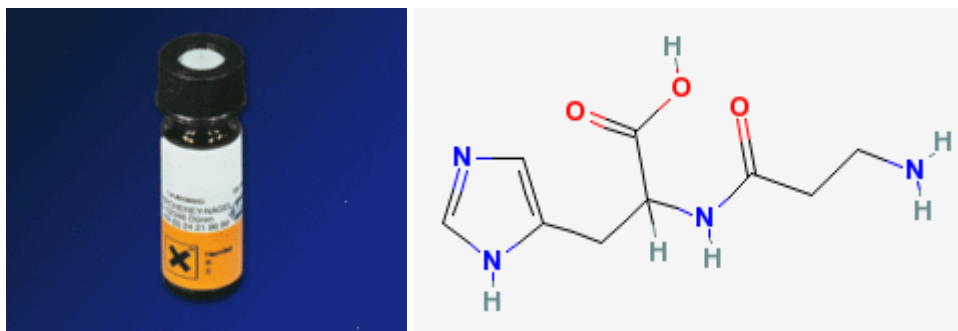
Εικόνα 2.3. Δείγματα απομονωμένου DNA καλής ποιότητας, διατηρώντας ακέραιη τη ζώνη τους.



Εικόνα 2.4. Δείγματα απομονωμένου DNA όχι πολύ καλής ποιότητας, τα οποία παρουσιάζουν smear.

2.4 Καθαρισμός απομονωμένου DNA

Γενικά, κατά την απομόνωση DNA με το παραπάνω πρωτόκολλο, λαμβάνονται και προσμίξεις από RNA (Εικόνα 2.6). Οπότε, κρίνεται απαραίτητη η προσθήκη του ενζύμου RNase για την απομάκρυνσή τους. Χρησιμοποιούμε το σκεύασμα RNase A της Macherey-Nagel 50 mg (Εικόνα 2.5), το οποίο φυλάσσεται στο ψυγείο (4 °C).



Εικόνα 2.5. α) Σκεύασμα, β) μοριακή δομή της RNase A.

Διαδικασία παρασκευής stock solution της RNase.

- Προσθήκη 2,5 ml sterile water στο φιαλίδιο που περιέχει 50 mg ενζύμου. (σε σκόνη)
- Μεταφορά 100 μl διαλύματος RNase από το φιαλίδιο σε νέο αποστειρωμένο μικροσωληνίσκο eppendorf με προσθήκη 100 μl H₂O. (sterile water)

Θέλουμε τελική συγκέντρωση RNase 10 mg/ml ή ισοδύναμα 10 μg/μl διαλύματος.

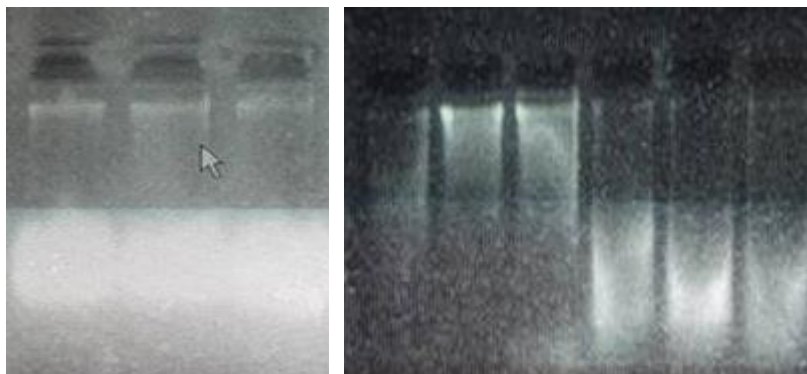
Προετοιμασία της RNase.

- Στο υδατόλουτρο, στους 65 °C ,θερμαίνουμε για 15 λεπτά το έτοιμο προς χρήση stock solution του ενζύμου.
- Αφήνουμε να κρυώσει σιγά σιγά, πρώτα στον πάγο σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά κι έπειτα στον πάγο μέχρι την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας.

Προσθήκη της στα δείγματα του απομονωμένου DNA.

- Σε νέους (κατά προτίμηση μεσαίους ή μικρούς) μικροσωληνίσκους eppendorf μεταφέρουμε 10 μl από το αρχικό μας δείγμα των 40 μl. Τα κρατάμε κλειστά στον πάγο.
- Στους νέους αυτούς μικροσωληνίσκους προστίθενται 0,1 μl ενζύμου RNase.
- Επιστρέφουμε το ένζυμο στο ψυγείο (4 °C).
Στο ψυγείο, επίσης, διατηρούμε τα νέα δείγματα DNA, overnight (πρακτικά: 12 έως 24 ώρες) για να πραγματοποιηθεί η ζητούμενη ενζυμική αντίδραση.
- Την επόμενη μέρα είτε επαναφωτομετρούμε τα δείγματα αυτά, είτε τα διατηρούμε στους -20 °C έως ότου ευκαιρήσουμε (σύντομα) να τα επαναφωτομετρήσουμε.

Με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω, φωτομετρήθηκε η ποσότητα του DNA για να διαπιστωθεί η ποσότητα που ελήφθη μετά τον καθαρισμό του. Για την ποιότητα-καθαρότητα του DNA ισχύουν τα ίδια, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω.



Εικόνα 2.6. α) Δείγματα απομονωμένου DNA με RNA προσμίξεις. β) 3 ίδια δείγματα απομονωμένου DNA με RNA προσμίξεις μετά και πριν την προσθήκη RNase.

2.5 Δοκιμαστικά-προκαταρκτικά πειράματα επιλογής συνθηκών PCR και εκκινητών

Η κατάλληλη επιλογή των χρησιμοποιούμενων εκκινητών έγινε με πληθώρα δοκιμαστικών πειραμάτων σε 3 δείγματα DNA καλής καθαρότητας.

Ακολουθήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR ως προς την αρχική ποσότητα του DNA-εκμαγείου, τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και τη θερμοκρασία υβριδισμού κάθε εκκινητή.

Ελέγχοντας διάφορους εκκινητές στα δείγματα αυτά, επιλέχθηκαν όσοι παρείχαν σαφές, κατατοπιστικό, πολύμορφο προφίλ για την διερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας του μελετώμενου φυτικού είδους και παρέχονταν σε ποσότητες ικανές να καλύψουν όλες τις πειραματικές αναλύσεις.

Για τα πειράματα που αφορούσαν την ανάλυση παραλλακτικότητας η συγκέντρωση των DNA δειγμάτων ορίστηκε στα 15 ng/μl. Οι αραιώσεις στα δείγματα, τελικής συγκέντρωσης 15 ng/μl, έγιναν βασιζόμενες στις μετρήσεις του σπεκτοφωτόμετρου μετά τον καθαρισμό τους με προσθήκη του ενζύμου RNase A.

2.6 Ανάλυση γενετικής παραλλακτικότητας με χρήση μοριακών δεικτών ISSR

2.6.1 Χρησιμοποιούμενοι εκκινητές

Για την ανάλυση ISSR χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο 7 εκκινητών (Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου British Columbia , Καναδάς) που εκπροσωπούν δι- και πενταμερείς επαναλήψεις (UBC σετ # 6 , Πίνακας 2.2.)

Πίνακας 2.2. Θερμοκρασίες υβριδισμού και αλληλουχίες νουκλεοτιδίων των χρησιμοποιούμενων εκκινητών του πειράματος.

ISSR εκκινητής (primer)	Θερμοκρασία υβριδισμού (annealing temperature) (°C)	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')
UBC 807	53	AGAGAGAGAGAGAGAGT
UBC 826	53	ACACACACACACACC
UBC 811	50	GAGAGAGAGAGAGAGAC
UBC 841	50	GAGAGAGAGAGAGAGAY*C
UBC 818	45	CACACACACACACAG
UBC 850	42	GTGTGTGTGTGTGTGT*CY
UBC 880	40	GGAGAGGAGAGGAGA

Y* = C+T (πυριμιδίνες)

2.6.2 Πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR για ISSR

Το αρχικό στάδιο αποδιάταξης έγινε στους 94 °C για 4 λεπτά, ακολουθούμενο από 37 κύκλους των 30 δευτερολέπτων για θερμική αποδιάταξη στους 94 °C ,1 λεπτό για υβριδισμό στην annealing temperature, η οποία ποικίλλει για κάθε εκκινητή (Πίνακας 2.2.) και 2 λεπτά για επιμήκυνση του κάθε εκκινητή προς σύνθεση νέου κλώνου στους 72 °C. Μετά το πέρας των κύκλων ακολούθησε ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης των νέων κλώνων για 7 λεπτά στους 72 °C. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα παραγόμενα προϊόντα διατηρούνταν στους 4°C .

Έγινε χρήση του θερμοκυκλοποιητή DNA Engine Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research, Watertown, USA), (Εικόνα 2.7) ο οποίος διαθέτει 2 διαμερίσματα τα οποία μπορούν να λειτουργούν είτε ταυτόχρονα είτε ανεξάρτητα.



Εικόνα 2.7. Η συσκευή pcr που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα.

2.6.3 Πρωτοκόλλο PCR για ISSR

Ο τελικός όγκος του μείγματος της αντίδρασης ορίστηκε στα 20 μ l, με 19 μ l master mix + 1 μ l αραιωμένο (με sterile water) δείγμα αρχικού DNA ώστε να περιέχει περίπου 15 ng DNA. Το master mix περιείχε τα εξής συστατικά τα οποία προστίθενταν με τη σειρά:

11,6 μ l sterile water

4 μ l ρυθμιστικού διαλύματος Kapa Taq buffer 5x (1X)

2 μ l MgCl₂ 25 mM (2,5 mM)

0,6 μ l DNTPs mixture 10 μ M each (0,3 μ M each)

0,6 μ l primer issr 10 μ M (0,3 μ M)

0,2 μ l Taq polymerase 5u/ μ l (1u)

Ο αρνητικός μάρτυρας (negative control) περιείχε μόνο 19 μ l master mix.

Η παρακάτω Εικόνα 2.8. δείχνει τα χρησιμοποιούμενα στις pcr συστατικά.



Εικόνα 2.8. Τα σετ αντιδραστηρίων των Taq DNA πολυμερασών που χρησιμοποιούταν στις pcr.

Η όλη αυτή πειραματική διαδικασία πραγματοποιούταν σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar) (Εικόνα 2.9), ο οποίος καθαριζόταν σχολαστικά με φαρμακευτικό διάλυμα Dettol, όπως το ίδιο γινόταν για απολύμανση πιπετών, ακρορυγχίων με φίλτρο, μικροσωληνίσκων όλων των μεγεθών πριν αποστειρωθούν με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας υν για 10-15 λεπτά. Επιπλέον, όλοι οι χειρισμοί των συστατικών της pcr πραγματοποιούνταν σε αποστειρωμένο με υν δοχείο τριμμένου πάγου.



Εικόνα 2.9. Θάλαμος νηματικής ροής του εργαστηρίου με όλο τον εξοπλισμό αποστειρωμένο πριν την έναρξη του πειράματος

2.6.4 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Η ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης PCR πραγματοποιήθηκε σε gel agarose 1,5% (2,25 gr agarose/150 ml TBE buffer 0,5X) σε TBE buffer 0,5X (παράρτημα 5) χρησιμοποιώντας τη συσκευή Mupid (Εικόνα 2.11). Στην πηκτική αгарόζης είχε γίνει pre-stain με 3,5 μl EtBr. Ο απαιτούμενος χρόνος για ικανοποιητικό διαχωρισμό των προϊόντων PCR ήταν 1,5-2 ώρες, εφαρμόζοντας τάση 50 Volt για τα 20 πρώτα λεπτά της διαδικασίας κι επιτάχυνση στα 100 Volt έως τον τερματισμό της.

Στα κελιά του gel φορτώνονταν είτε απευθείας 3 μl προϊόν pcr (εάν χρησιμοποιούταν η Promega taq polymerase, η οποία συνοδευόταν από έγχρωμο reaction buffer), είτε 2 μl προϊόν pcr + 0,5 μl water + 0,5 μl loading dye (6X) = 3 μl δάλυμα φόρτωσης (εάν χρησιμοποιούταν η Kapa Biosystems taq polymerase, η οποία συνοδευόταν από άχρωμο διάφανο reaction buffer).

Επίσης, μετά από δοκιμαστικά πειράματα ηλεκτροφόρησης, ο ladder τελικά φορτωνόταν σε αναλογία 1,5 μl ladder + 1,5 μl mol. water.

Μετά το πέρας κάθε ηλεκτροφόρησης, η πηκτική τοποθετούταν στη συσκευή φωτογράφισης MiniBis Pro της εταιρείας DNR Bio-Imaging Systems η οποία ήταν συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή και διέθετε ειδική τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας UV (Εικόνα 2.10). Οι φωτογραφικές λήψεις, που έγιναν με το λογισμικό Gel capture κατά την έκθεση της πηκτής σε UV για την ποσοτικοποίηση της έντασης του σήματος, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 2.10. Η φωτογραφική συσκευή MiniBis Pro της DNR Bio-Imaging Systems με το εξάρτημα της τράπεζας UV.



Εικόνα 2.11. Οι συσκευές ηλεκτροφόρησης α) Mupid και β) Thermofiscer του εργαστηρίου.

2.6.5 Υπολογισμός μεγέθους ενισχυμένης ζώνης

Το μέγεθος των προϊόντων της αντίδρασης προσδιορίστηκε βάσει πρότυπων μεγεθών DNA του 100 bp dna ladder H3 RTU της εταιρείας NIPPON Genetics Europe, δίνοντας 12 τμήματα με γνωστά μεγέθη όπως στην Εικόνα 2.12.



Εικόνα 2.12. Αντιστοίχιση μεγέθους των τμημάτων του πρότυπου DNA που χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης μεγέθους.

Με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Microsoft excel, σχεδιάστηκε γραφική παράσταση, ο οριζόντιος άξονας της οποίας βαθμονομήθηκε με την απόσταση D (cm) κάθε τμήματος πρότυπου DNA της Εικόνας 2.12 από το 1^ο τμήμα, ενώ ο κατακόρυφος άξονας βαθμονομήθηκε με το μέγεθος (bp) κάθε τμήματος πρότυπου DNA. Κατόπιν, προσδιορίστηκε η γραμμική εξίσωση που αντιστοιχούσε στην εν λόγω γραφική παράσταση. Με μέτρηση των αποστάσεων των ενισχυμένων ζωνών από το 1^ο τμήμα του πρότυπου DNA και την εισαγωγή τους στη γραμμική εξίσωση, υπολογίστηκε το μέγεθος (bp) κάθε ενισχυμένης ζώνης. Να σημειωθεί ότι το μέγεθος αυτό δεν είναι το ακριβές πραγματικό κάθε ενισχυμένης ζώνης διότι προκύπτει από προσαρμογή της γραφικής παράστασης σε γραμμικό πρότυπο. Οπότε, το προσαρμοσμένο μέγεθος που υπολογίζεται, χρησιμοποιείται μόνο για «τιτλοδότηση» των ενισχυμένων ζωνών.

2.6.6 Καταγραφή δεδομένων

Κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης, έγινε εισαγωγή των δεδομένων για κάθε εκκινητή για όλα τα δείγματα των 5 πληθυσμών του φυτικού είδους *C. graecum*. Έτσι, κατασκευάστηκε πίνακας-μήτρα για κάθε εκκινητή στον οποίο εμφανιζόταν η παρουσία ή απουσία κάθε ενισχυμένης με pcr ζώνης που είχε «τιτλοδοτηθεί» με το μέγεθος της (bp), όπως περιγράφεται παραπάνω. Τα αποτελέσματα αυτά καταγράφηκαν σε δυαδικό σύστημα, όπου με 1 δηλωνόταν η παρουσία ενισχυμένης ζώνης, ενώ με 0 απουσία της. Να σημειωθεί ότι καταγράφηκαν μόνο οι διακριτές και με επαναληψιμότητα ζώνες. Η δυαδική αυτή μήτρα χρησιμοποιήθηκε έπειτα προς αριθμητική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

2.7 Μοριακή στατιστική ανάλυση

Η μοριακή στατιστική ανάλυση περιλαμβάνει τόσο ενδοπληθυσμιακή όσο και διαπληθυσμιακή ανάλυση. Η ενδοπληθυσμιακή περιλαμβάνει τους ακόλουθους υπολογισμούς, οι μαθηματικοί τύποι των οποίων δίνονται στο παράρτημα 6.

1. Αριθμός διαφορετικών αλληλομόρφων (Na).
2. Αριθμός δραστικών αλληλομόρφων (Ne).
3. Συχνότητες αλληλομόρφων (p,q), οι οποίες αφορούν απλοειδή δυαδικά δεδομένα.
4. Αναμενόμενη ετεροζυγωτία (h).
5. Παρατηρηθείσα - πραγματική ετεροζυγωτία – (uh).
6. Ποσοστό πολυμορφισμού ανά πληθυσμό (P).

Επιπλέον, για κάθε πληθυσμό υπολογίστηκαν στο σύνολο των μικροδορυφορικών γονιδιακών θέσεων οι παράμετροι:

1. Αριθμός αλληλομόρφων
2. Αριθμός αποκλειστικών αλληλομόρφων
3. Αριθμός τοπικά κοινών αλληλομόρφων
4. Αναμενόμενη ετεροζυγωτία (h).
5. Παρατηρηθείσα - πραγματική ετεροζυγωτία (uh).
6. Δείκτης ποικιλότητας κατά Shannon (I).

Όλοι οι παραπάνω υπολογισμοί της πληθυσμιακής γενετικής ανάλυσης έγιναν με τη βοήθεια των λογισμικών Genetix 4.05 (<http://kimura.univ-montp2.fr/genetix/>) και Popgene (<https://sites.ualberta.ca/~fyeh/index.html>).

Ο αριθμός των αλληλομόρφων, ο αριθμός των αποκλειστικών αλληλομόρφων (αλληλόμορφοι που απαντώνται μοναδικά σε έναν πληθυσμό) και ο αριθμός των τοπικά κοινών αλληλομόρφων υπολογίστηκαν με το λογισμικό HP-RARE (Kalinowski, 2005).

Οι αμερόληπτες γενετικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών εκτιμήθηκαν σύμφωνα με τον Nei (1978) κάνοντας χρήση του λογισμικού PopGene32 (Yeh et al., 1999). Οι σχέσεις μεταξύ των πληθυσμών αρχικά διευρύνθηκαν με τη μη UPGMA, κατασκευάζοντας δενδρόγραμμα βασισμένο στις γονιδιακές αποστάσεις κατά Nei (1978) για τους ISSR μοριακούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

Η ιεραρχική δομή της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ και εντός των πληθυσμών χαρακτηρίστηκε επίσης από την ανάλυση μοριακής διακύμανσης (AMOVA: Excoffier et al., 1992, Michalakis & Excoffier, 1996). Πραγματοποιήθηκε ιεραρχική AMOVA χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο GENALEX 6 (Peakall & Smouse, 2006). Οι δοκιμές εκτελέστηκαν χρησιμοποιώντας εκτιμήσεις βασιζόμενες σε αποστάσεις PhiPT. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες σημαντικότητας χρησιμοποιώντας 999 συνδυασμούς εντός του συνόλου των δεδομένων.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κύριων συντεταγμένων (PCoA) για τις πρώτες 2 κύριες συνιστώσες με χρήση του προγράμματος GeneAIEx 6.0 (Peakall & Smouse, 2006).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αριθμητικά αποτελέσματα φωτομέτρησης και ποσοτικού-ποιοτικού προσδιορισμού DNA

Στο παρόν πείραμα, ακολουθήθηκε η κλασική διαδικασία εξαγωγής DNA από τα φυτικά δείγματα με CTAB (Doyle & Doyle, 1987), με ορισμένες τροποποιήσεις της μεθόδου σε κάποια σημεία της, λαμβάνοντας τελικά ικανοποιητικά-αν όχι άριστα αποτελέσματα, έπειτα από δοκιμαστικά πειράματα με 2 διαφορετικά φυτικά δείγματα.

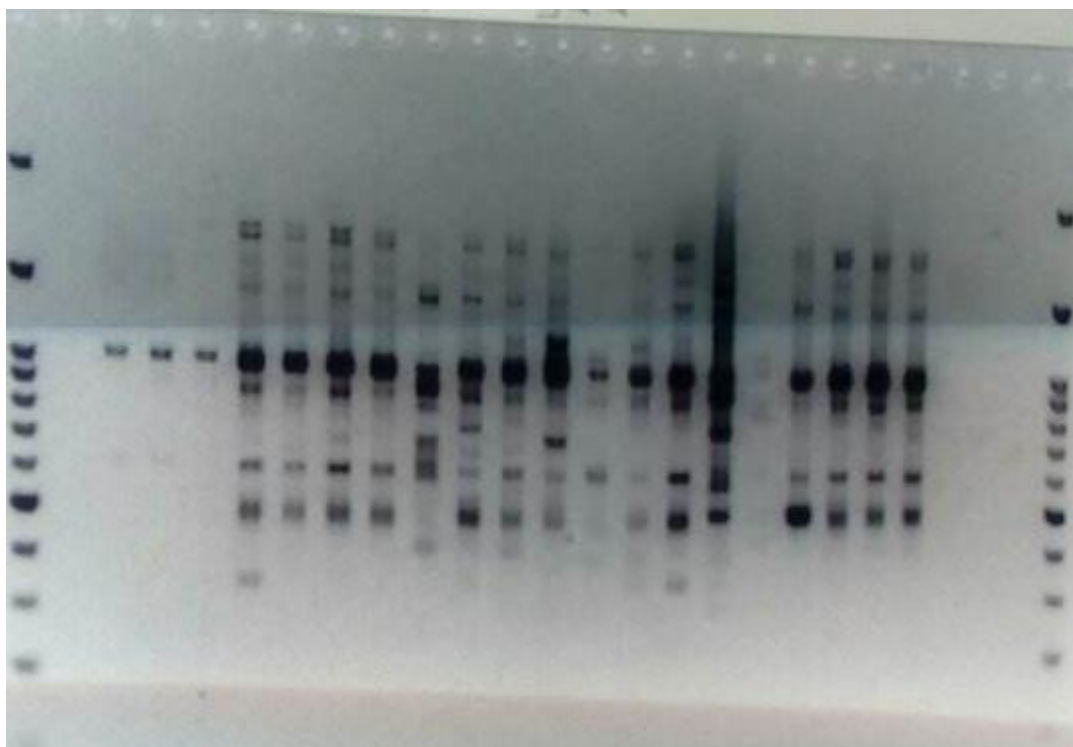
Στους πίνακες Π.1 & Π.2 του παραρτήματος 9 παρουσιάζονται όλες οι μετρήσεις των συγκεντρώσεων DNA και των λόγων καθαρότητας A260nm/ A280nm και A260nm/ A230nm στα 97 δείγματα που έδωσε το σπεκτοφωτόμετρο nanodrop τόσο των απομονωμένων DNA από τα φυτικά δείγματα, όσο και των τελικών DNA-καθαρισμένων με προσθήκη RNase, τα οποία τελικά χρησιμοποιήθηκαν σε όλο το πείραμα.

Οι απομονώσεις του DNA από τα δείγματα έδωσαν επαρκή ποσότητα για τις αντιδράσεις της PCR. Μετά από δοκιμαστικές αντιδράσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις DNA η ποσότητα των 15 ng κρίθηκε ότι δίνει ικανοποιητικά προϊόντα κατά τις αντιδράσεις PCR. Οπότε, κάθε δείγμα αραιώθηκε στα 15 ng/μl ώστε να υπάρχει κατά το δυνατόν ομοιομορφία σε όλα τα μελετώμενα δείγματα.

3.2 Πολυμορφισμός ISSR εκκινητών

Πραγματοποιήθηκε προκαταρκτικό πείραμα στο οποίο δοκιμάστηκαν 13 διαφορετικοί εκκινητές για ενίσχυση του DNA δύο δειγμάτων. Με βάση την πληροφοριοδοτική ικανότητα, επιλέχθηκαν 7 εκκινητές δίνοντας το μεγαλύτερο πολυμορφισμό και τις περισσότερες ευδιάκριτες ζώνες (bands). Μάλιστα, οι εκκινητές UBC 807,818,880 έχουν δείξει ιδιαίτερο πολυμορφισμό σε ανάλογες μοριακές μελέτες γενετικής παραλλακτικότητας του γένους *Cicer* κι άλλων ειδών ψυχανθών. Οι υπόλοιποι εκκινητές είτε δεν έδωσαν ευδιάκριτα προϊόντα ενίσχυσης είτε δεν έδωσαν καθόλου είτε έδωσαν λιγότερα από τους επιλεγθέντες.

Ο σαφέστερος διαχωρισμός των ενισχυμένων ζωνών DNA επιτεύχθηκε κατόπιν πολλών δοκιμαστικών συνδυασμών της συγκέντρωσης της πηκτής αгарόζης, της ταχύτητας της ηλεκτροφόρησης, της χρησιμοποιούμενης ποσότητας προϊόντος pcr και του είδους της χρησιμοποιούμενης χρωστικής ουσίας για τα νουκλειικά οξέα. Οι ενισχυμένες ζώνες DNA ήταν πιο ευδιάκριτες όταν η ηλεκτροφορηση γινόταν σε πηκτή αгарόζης 2% w/v με σταθερή τάση 50 Volt για περίπου τρεις ώρες, όπου η Εικόνα 3.1. απεικονίζει ένα χαρακτηριστικό τέτοιο παράδειγμα. Ωστόσο, για οικονομία χρόνου στην πειραματική διαδικασία, κατά βάση χρησιμοποιήθηκε πηκτή αгарόζης 1,5% w/v δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα προς αξιολόγηση. Στο παράρτημα 7 παρατίθενται χαρακτηριστικές εικόνες των ενισχυμένων ζωνών DNA σε πληθυσμούς του *C. graecum* με όλους τους εκκινητές του πειράματος.



Εικόνα 3.1. Πλήρης διαχωρισμός των προϊόντων PCR του 3^{ου} πληθυσμού του μελετώμενου *C. graecum* με τον εκκινητή UBC 818 σε πηκτική αγαρόζης 2%.

3.3 Γενετική παραλλακτικότητα εντός των πληθυσμών

Ένα σύνολο 145 ISSR ζωνών ελήφθησαν από τους 7 επιλεγμένους εκκινητές του πειράματος αντιστοιχώντας κατά μέσο όρο σε 20,7 ανά εκκινητή. Το μέγεθος των ενισχυμένων αυτών ζωνών κυμαινόταν από 100 bp (UBC 811) έως 2077 bp (UBC 826). Το % ποσοστό πολυμορφισμού (P) σε επίπεδο πληθυσμού κυμαινόταν από 59,31 % (πληθυσμός 3) έως 68,97 % (πληθυσμός 1) με μέσο όρο 64,28% σε όλους τους πληθυσμούς. Ο δραστηκός αριθμός των αλληλομόρφων ανά γενετική θέση (N_e) κυμαινόταν από 1,308 (πληθυσμός 1) έως 1,395 (πληθυσμός 4) δείχνοντας παρόμοιες τάσεις με γενικό μέσο όρο 1,341 για όλους τους πληθυσμούς. Η τιμή του δείκτη Shannon (I) κυμάνθηκε από 0,287 (πληθυσμός 3) έως 0,345 (πληθυσμός 1) με γενικό μέσο όρο 0,313 στους πληθυσμούς. Ο συντελεστής γενετικής παραλλακτικότητας (h) κυμαινόταν από 0,188 (πληθυσμός 3) έως 0,228 (πληθυσμός 4) ενώ ο συντελεστής της πραγματικής γενετικής παραλλακτικότητας (uh) από 0,198 (πληθυσμός 3) έως 0,243 (πληθυσμός 4). Ταυτόχρονα οι παράμετροι h , uh είχαν γενικό μέσο όρο στους πληθυσμούς 0,205 και 0,217 αντίστοιχα. Σημειωτέον είναι ότι 65% της συνολικής γενετικής παραλλακτικότητας αποδίδεται στην ενδοπληθυσμιακή διαφοροποίηση (Εικόνα 3.3). Τέλος, η γενετική παραλλακτικότητα του συνολικού δείγματος ήταν σχετικά υψηλή ($N_e=1,341$, $I=0,313$ $h=0,205$). Οι ακόλουθοι πίνακες 3., 3.2, 3.3 παρουσιάζουν συγκεντρωτικά όλα τα παραπάνω αποτελέσματα για όλους τους μελετώμενους πληθυσμούς,

Πίνακας 3.1. Μετρήσεις γενετικής παραλλακτικότητας σε επίπεδο πληθυσμού για τους 5 φυσικούς πληθυσμούς *C. graecum*.

Mean and SE over Loci for each Pop							
Pop		N	Na	Ne	I	H	Uh
Population 1	Mean	21,000	1,379	1,374	0,345	0,227	0,238
	SE	0,000	0,077	0,029	0,022	0,015	0,016
Population 2	Mean	20,000	1,324	1,308	0,300	0,192	0,202
	SE	0,000	0,079	0,027	0,021	0,015	0,016
Population 3	Mean	20,000	1,200	1,310	0,287	0,188	0,198
	SE	0,000	0,081	0,029	0,022	0,016	0,016
Population 4	Mean	16,000	1,310	1,395	0,340	0,228	0,243
	SE	0,000	0,078	0,032	0,024	0,017	0,018
Population 5	Mean	20,000	1,297	1,316	0,294	0,191	0,201
	SE	0,000	0,078	0,029	0,022	0,016	0,016

Πίνακας 3.2. Γενικοί μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα μετρήσεων γενετικής παραλλακτικότητας για τους 5 φυσικούς πληθυσμούς *C. graecum*.

Grand Mean and SE over Loci and Pops							
		N	Na	Ne	I	H	uh
Total	Mean	19,400	1,302	1,341	0,313	0,205	0,217
	SE	0,065	0,035	0,013	0,010	0,007	0,007

Πίνακας 3.3. Ποσοστά πολυμορφισμού καθενός από τους 5 φυσικούς πληθυσμούς *C. graecum*.

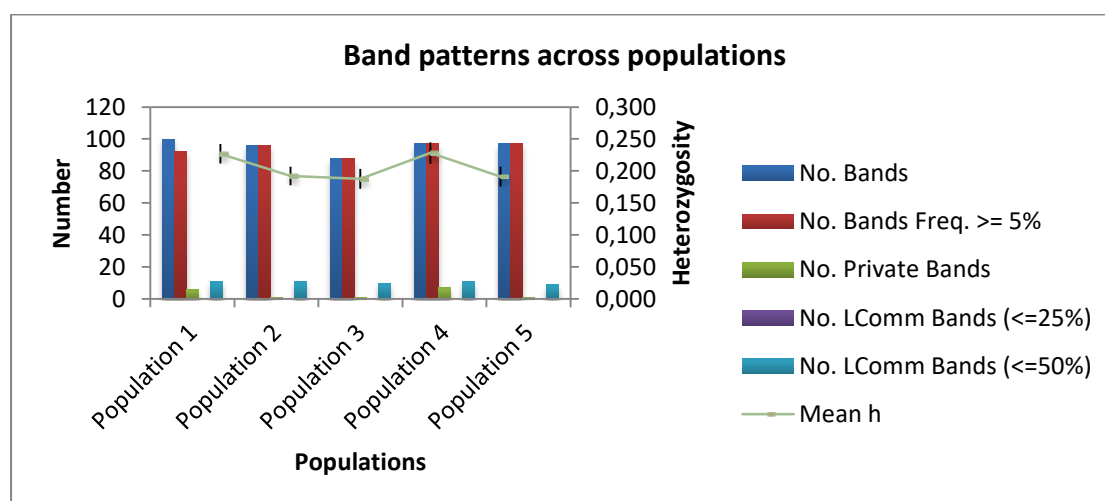
Percentage of Polymorphic Loci		
Population	%P	
Population 1	68,97%	
Population 2	66,21%	
Population 3	59,31%	
Population 4	64,14%	
Population 5	62,76%	
Mean	64,28%	
SE	1,62%	

3.4 Γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών

Ξεχωριστά για κάθε πληθυσμό υπολογίστηκαν στο σύνολο των μικροδορυφορικών γονιδιακών θέσεων οι παράμετροι:

- Αριθμός ζωνών
- Αριθμός ζωνών συχνότητας $\geq 5\%$
- Αριθμός αποκλειστικών ζωνών
- Αριθμός τοπικά κοινών ζωνών με ποσοστά $\leq 25\%$ και $\leq 50\%$
- Μέση ετεροζυγωτία (h).

Οι μετρήσεις αυτές παρουσιάζονται διαγραμματικά στην Εικόνα 3.2 και αριθμητικά στον Πίνακα 3.4.

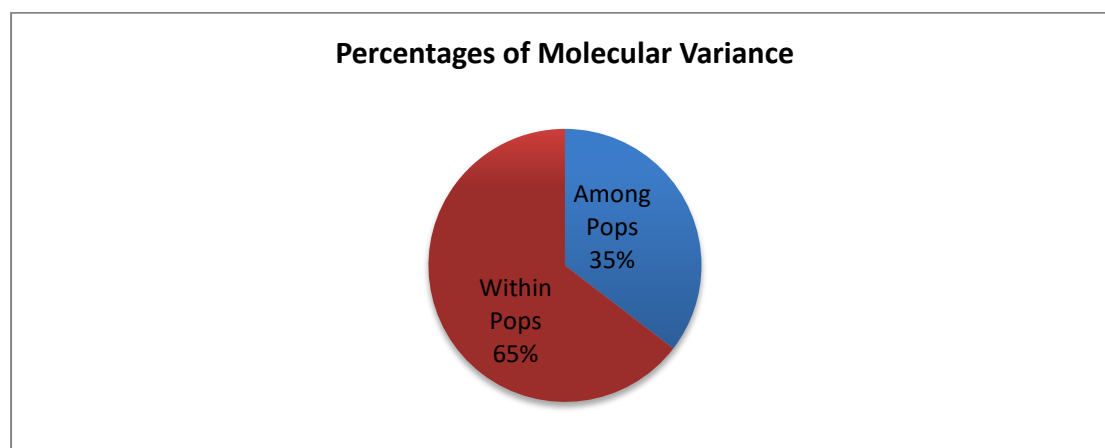


Εικόνα 3.2. Διαγραμματική κατανομή των ενισχυμένων ζωνών με ISSR μοριακούς δείκτες στους 5 φυσικούς πληθυσμούς του *C. graecum*.

Πίνακας 3.4. Αναλυτικές μετρήσεις των δεδομένων που αναφέρονται στην Εικόνα 3.2.

Total Band Patterns for Binary (Haploid) Data by Populations					
Population	Population 1	Population 2	Population 3	Population 4	Population 5
No. Bands	100	96	88	97	97
No. Bands Freq. $\geq 5\%$	92	96	88	97	97
No. Private Bands	6	1	1	7	1
No. LComm Bands ($\leq 25\%$)	0	0	0	0	0
No. LComm Bands ($\leq 50\%$)	11	11	10	11	9
Mean h	0,227	0,192	0,188	0,228	0,191
SE of Mean h	0,015	0,015	0,016	0,017	0,016
Mean uh	0,238	0,202	0,198	0,243	0,201
SE of Mean uh	0,016	0,016	0,016	0,018	0,016

Η γενετική διαφοροποίηση είναι μια σημαντική παράμετρος στην αξιολόγηση της γενετικής δομής των πληθυσμών ενός είδους. Για τα συνολικά δεδομένα των ISSR δεικτών, σύμφωνα με τη μέθοδο AMOVA εντοπίστηκαν πολύ σημαντικές γονιδιακές διαφορές ($p < 0,001$) μεταξύ των 5 φυσικών πληθυσμών *C. graecum*. Μάλιστα 35% της ολικής γενετικής παραλλακτικότητας οφείλεται στη διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών. Η στατιστική τιμή $\Phi_{iPT} = 0,354$ του Πίνακα 3.5 της AMOVA υποδεικνύει διαπληθυσμιακή διαφοροποίηση καθώς συμφωνεί με τα αποτελέσματα του δείκτη Shannon (I) και του συντελεστή γενετικής ποικιλότητας του Nei (GD), ο οποίος αναλύεται λεπτομερέστερα παρακάτω.



Εικόνα 3.3. Κατανομή των ποσοστών της μοριακής γενετικής παραλλακτικότητας (AMOVA) εντός και μεταξύ των 5 φυσικών πληθυσμών.

Πίνακας 3.5. Σύνοψη της ανάλυσης μοριακής γενετικής παραλλακτικότητας (AMOVA) για τους 5 φυσικούς πληθυσμούς *C. graecum* βασιζόμενη σε ISSR μοριακούς δείκτες.

Source	df	SS	MS	Est.Var.	%
Among Pops	4	726,410	181,603	8,572	35%
Within Pops	92	1438,208	15,633	15,633	65%
Total	96	2164,619		24,205	100%
Stat	Value	P(rand >= data)			
PhiPT	0,354	0,001			
PhiPT max	0,784				
Phi'PT	0,452				

Η ποικιλομορφία των 5 αυτοφυών πληθυσμών εξηγήθηκε μετρώντας την παραλλακτικότητα με βάση την τιμή του Nei (GD), καθώς και του δείκτη Shannon (I). Τα δεδομένα για την τιμή GD και του δείκτη I, για όλους τους πληθυσμούς, αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας 7 δείκτες ISSR και η μέση τιμή τους βρέθηκε 0,205

και 0,313 αντίστοιχα. Να σημειωθεί ότι οι τιμές των δεικτών I,GD είναι ανεξάρτητες από το πληθυσμιακό μέγεθος του δείγματος.

Για περαιτέρω έλεγχο της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των 5 πληθυσμών του *Cicer graecum*, αξιολογήθηκαν οι αμερόληπτες γενετικές αποστάσεις κατά Nei (1978) όπως καταγράφονται στους Πινάκες 3.6 & 3.7. Οι αποστάσεις αυτές (κάτω από τη διαγώνιο) κυμαίνονταν από 0,131 έως 0,272. Η ελάχιστη τιμή 0,131 αντιστοιχεί μεταξύ των πληθυσμών 1&5 ενώ η μέγιστη 0,272 μεταξύ των πληθυσμών 3&4. Τα ακριβώς ίδια αποτελέσματα προκύπτουν χρησιμοποιώντας τις συμπληρωματικές συχνότητες (p,q) των αλληλομόρφων.

Πίνακες 3.6 & 3.7. Γονιδιακές αποστάσεις κατά Nei (1978) όπως υπολογίστηκαν για τους 5 φυσικούς πληθυσμούς *C. graecum*.

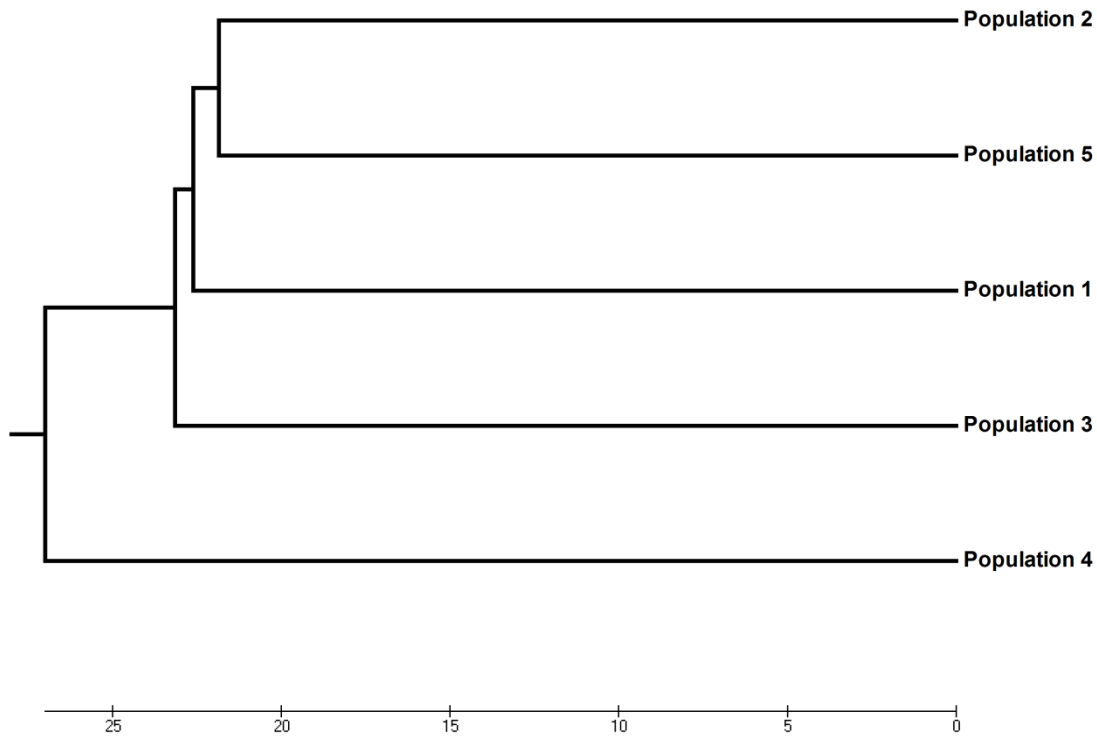
Nei Genetic Distance	Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance				
Population 1	Population 2	Population 3	Population 4	Population 5	
0,000					Population 1
0,147	0,000				Population 2
0,154	0,167	0,000			Population 3
0,182	0,237	0,272	0,000		Population 4
0,131	0,146	0,180	0,211	0,000	Population 5

Nei Genetic Distance	Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Identity				
Population 1	Population 2	Population 3	Population 4	Population 5	
1,000					Population 1
0,864	1,000				Population 2
0,857	0,846	1,000			Population 3
0,834	0,789	0,762	1,000		Population 4
0,877	0,864	0,836	0,810	1,000	Population 5

Οι μελετώμενοι πληθυσμοί ομαδοποιήθηκαν σε συστάδες με τη μέθοδο της μη σταθμισμένης ομαδοποίησης αριθμητικών ζευγών μέσω (Unweighed Pair Group Method with Arithmetic Mean - UPGMA). Μεταξύ των διαφορετικών συσσωρευτικών ιεραρχικών μεθόδων ανάλυσης, ο συγκεκριμένος αλγόριθμος αποτελεί την περισσότερο αποδεκτή μέθοδο ανάλυσης σε συστάδες (Mohammadi & Prassana, 2003). Κύριο χαρακτηριστικό της είναι ότι ελαχιστοποιεί την απόσταση μεταξύ των ομάδων υπολογίζοντας τη μέση απόσταση ανά ζεύγος μεταξύ όλων των ατόμων του δείγματος (Measures of genetic diversity, 2003).

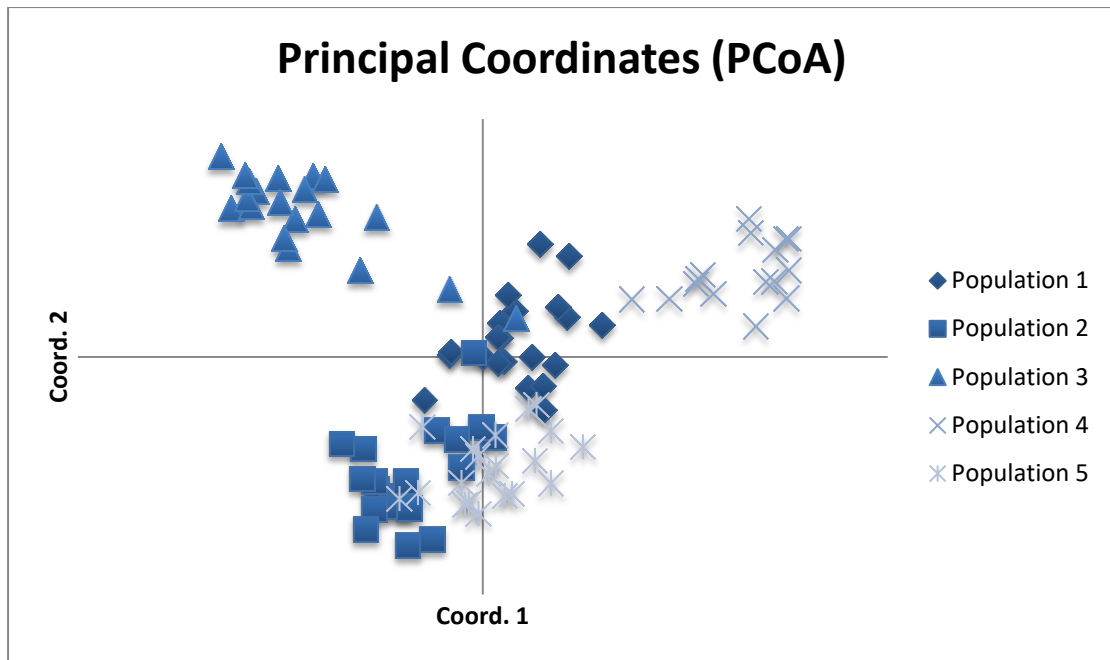
Οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών απεικονίζονται σε δενδρόγραμμα χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο UPGMA με βάση την απόσταση κατά Nei (1978). Ένα δενδρόγραμμα που προήλθε από τη χρήση των ISSR δεικτών ομαδοποίησε τους πέντε πληθυσμούς σε δύο κύριες ομάδες (Εικόνα 3.4). Ο πληθυσμός 4 σχημάτισε ξεχωριστή ομάδα που δηλώνει την ελάχιστο ομοιότητα με τους άλλους

τέσσερις υπό μελέτη πληθυσμούς. Η τελευταία ομάδα διαιρείται σε τρεις υπο-ομάδες που αποτελούνται από τους πληθυσμούς 2 με 5 (πρώτη υπο-ομάδα), 2 με 1 (δεύτερη υπο-ομάδα) και 3 με 1 (τρίτη υπο-ομάδα).



Εικόνα 3.4. UPGMA δενδρόγραμμα στηριζόμενο στις γονιδιακές αποστάσεις κατά Nei (1978), δείχνει τις σχέσεις των πέντε μελετώμενων πληθυσμών με χρήση ISSR δεικτών.

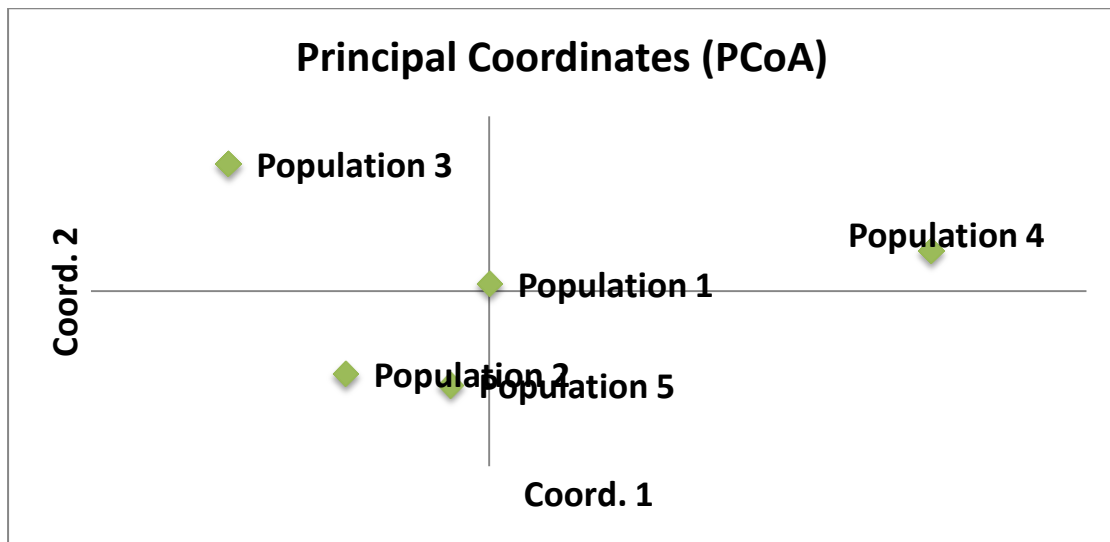
Τέλος, τα αποτελέσματα της ανάλυσης κύριων συντεταγμένων (PCoA) για τις πρώτες 2 κύριες συνιστώσες, απεικόνισαν 4 μεγάλες ομάδες αντιστοιχώντας τα μελετώμενα φυτικά δείγματα στις περιοχές συλλογής των αντίστοιχων πληθυσμών τους. Ο πληθυσμός 4 παρουσίασε πολύ σαφή διαχωρισμό από το σύμπλεγμα των υπόλοιπων πληθυσμών, όπως και ο πληθυσμός 3 διαχωρίστηκε ικανοποιητικά. (Εικόνες 3.5 & 3.6) Η ξεχωριστή ομάδα που σχημάτισε ο πληθυσμός 4 δηλώνει την ελάχιστο ομοιότητα με τους άλλους 4 υπό μελέτη πληθυσμούς, ενώ και ο πληθυσμός 3 έδειξε να διαφοροποιείται αρκετά από τους υπόλοιπους πληθυσμούς. Παρουσιάζονται, επίσης, οι Πίνακες 3.8 & 3.9 που δείχνουν το ποσοστό της παραλλακτικότητας που εξηγείται από κάθε άξονα των διαγραμμάτων.



Εικόνα 3.5. Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συντεταγμένων (PCoA) των 5 φυσικών πληθυσμών *C. graecum* με χρήση μοριακών δεικτών ISSR.

Πίνακας 3.8. Κατανομή των ποσοστών παραλλακτικότητας στους πρώτους 3 άξονες.

Axis	1	2	3
%	12,90	9,61	8,28
Cum %	12,90	22,51	30,79



Εικόνα 3.6. Μια διαφορετική απεικόνιση του διαγράμματος ανάλυσης κύριων συντεταγμένων (PCoA) των 5 φυσικών πληθυσμών *C. graecum* με χρήση μοριακών δεικτών ISSR με βάση το συντελεστή γενετικής ομοιότητας κατά Nei.

Πίνακας 3.9. Κατανομή των ποσοστών παραλλακτικότητας στους πρώτους 3 άξονες.

Axis	1	2	3
%	39,44	24,03	19,95
Cum %	39,44	63,47	83,42

4. Συζήτηση

Μέχρι σήμερα και έπειτα από βιβλιογραφική ανασκόπηση, είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιήθηκε μοριακή προσέγγιση στο γενετικό προφίλ του ενδημικού άγριου είδους *C. graecum* με μοριακούς δείκτες ISSR, ενώ γενικά η ανάλυση ISSR έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί σε πολυάριθμα φυτικά είδη, συμπεριλαμβανομένων κι όλων σχεδόν των ψυχανθών (οικογένεια: *Fabaceae*, στην οποία ανήκει και το μελετώμενο φυτικό είδος). Στην πληθυσμιακή ανάλυση οι γενετικοί δείκτες που βασίζονται στους μικροδορυφόρους είναι ένα ιδιαίτερο εργαλείο – κριτήριο για την ανίχνευση διαφοροποίησης εξαιτίας του υψηλού πολυμορφισμού τους. Όπως οι διαφορετικοί γενετικοί δείκτες έχουν διαφορετικές ιδιότητες αντανakλώντας διαφορετικές πτυχές της γενετικής ποικιλομορφίας (Karj et al., 1996), έτσι και οι ISSR μπορούν να συσχετίσουν την γενετική με τη γεωγραφική παραλλακτικότητα η οποία ορίζεται από την οικογεωγραφία του μελετώμενου φυτικού είδους.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση και η σύγκριση της γενετικής δομής και ποικιλομορφίας 5 αυτοφυών φυσικών πληθυσμών του σπάνιου ενδημικού είδους *C. graecum* με χρήση 7 κυρίαρχων μοριακών δεικτών ISSR, ενώ δυνητικά θα υποβοηθήσει στη δημιουργία πρακτικών διαχείρισης και διατήρησης του γενετικού υλικού του μελετώμενου φυτικού είδους.

Το *C. graecum* παρουσιάζει μικρούς απομονωμένους πληθυσμούς διάσπαρτων ατόμων. Η επίδραση της δημογραφίας στη γενετική εξελικτική ιστορία, όσον αφορά τη διατήρηση της γενετικής παραλλακτικότητας και της δομής των υπάρχοντων πληθυσμών θεωρείται ύψιστης σημασίας, προκειμένου να διασφαλιστεί η δυνατότητα προσαρμογής τους με ταυτόχρονη διατύπωση κατάλληλης διαχείρισης και διατήρησης στρατηγικών αειφορίας (Belletti et al. 2008, Boshier & Amaral, 2004)

4.1 Γενετική παραλλακτικότητα εντός των πληθυσμών

Είναι πλέον δεδομένο ότι η ανάλυση της γενετικής παραλλακτικότητας των υπαρχόντων φυτογενετικών πόρων συμβάλλει στην κλασσική βελτίωση των καλλιεργειών, ενώ η ελληνική φύση διαθέτει πλούτο φυτογενετικών πόρων που είναι χρήσιμη η μελέτη της γενετικής τους δομής με χρήση εργαλείων γενομικής τεχνολογίας. Η ανασκόπηση των Wettberg et al., (2018) υπογραμμίζει τη σημασία αξιοποίησης της ποικιλομορφίας των άγριων συγγενών *Cicer sp.*, η οποία περιορίζεται στο καλλιεργούμενο ρεβίθι λόγω εξημέρωσης και συνεχούς βελτίωσης της καλλιέργειας με τεχνητή επιλογή. Έτσι, είναι αναγκαία η επίσημη καταγραφή των άγριων πληθυσμών *Cicer sp.* με ταυτόχρονη εκτίμηση της περιβαλλοντικής επίδρασης στη γενετική δομή των προσαρμοστικών τους χαρακτηριστικών. Άγριοι συγγενείς γενετικά χαρτογραφημένοι με γνωστό γονότυπο, δυνητικά, συμβάλλουν στη συσχέτιση λειτουργικών γονιδιακών δεξαμενών μεταξύ των άγριων και του καλλιεργούμενου *C. arietinum.*, αποτελώντας βασικό συστατικό στα βελτιωτικά προγράμματα του *C. arietinum.*

Το υψηλό επίπεδο ετερογένειας που παρατηρήθηκε εντός των πέντε φυσικών πληθυσμών σχετίζεται άμεσα με την προσαρμοστικότητά τους (Harlan, 1992,

Tesemma & Bechere, 1998, Cooper et al., 2000), ενώ δείχνει να παραμένει ανεπηρέαστο από ανθρώπινες παρεμβάσεις διότι τυχόν ανθρώπινη επίδραση μπορεί να τροποποιήσει σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισης ορισμένων αλληλομόρφων (Zeven, 2002).

Όπως ήταν αναμενόμενο, τα αποτελέσματα της AMOVA έδειξαν ότι το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης κατανεμήθηκε εντός των πληθυσμών, όπου υπήρξε αξιόλογος πολυμορφισμός. Αυτό τυγχάνει να είναι σε αντίθεση με το συμπέρασμα ανάλογης πληθυσμιακής μελέτης άγριου μπιζελιού (*Pisum sativum subsp. elatius*) με SNP DARTseq δείκτες των SmyÅka et al., 2018 από τη βόρεια πλευρά της «Εύφορης Ημισελήνου» με τη γενετική παραλλακτικότητα να κατανέμεται κατά 63% μεταξύ των πληθυσμών και μόλις 19% εντός των πληθυσμών. Μάλιστα, οι γενετικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών αντικατοπτρίζουν γεωγραφική τους απόσταση και όχι την περιβαλλοντική ή την κλιματική. Επιπλέον, το τωρινό αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα μικροδορυφορικών δεικτών των Naghavi et al., 2012 από τοπικές ποικιλίες *C. arietinum* του Ιράν. Φάνηκε ότι η γενετική παραλλακτικότητα υπήρχε κυρίως μεταξύ των μελετώμενων ποικιλιών, κι όχι μεταξύ των περιοχών προέλευσής τους όπως ακριβώς με τους αυτοφυείς πληθυσμούς του *C. graecum*. Αυτό είναι μια σαφής ένδειξη ότι η έκταση της ενδοπληθυσμιακής παραλλακτικότητας είναι υψηλή, αλλά η έκταση της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των πληθυσμών είναι χαμηλή ή μέτρια, καθώς η στενή γενετική βάση του γένους *Cicer* είναι μία κύρια αιτία της αργής προόδου στη βελτίωση του ρεβιθιού.

Φαίνεται ότι οι υπό μελέτη πληθυσμοί παρουσιάζουν γενικά επαρκή αν όχι υψηλή γενετική παραλλακτικότητα ($H=0,205$) η οποία βεβαιώνει τη μελλοντική σταθερότητα τους. Αυτό είναι σε αντιστοιχία με το εύρημα $H= 0,238$ των Aggarwal et al., (2015) σχετικά με αξιολόγηση γενετικής ποικιλομορφίας γονοτύπων *C. arietinum* χρησιμοποιώντας STMS μοριακούς δείκτες δείχνοντας σχετική σταθερότητα στη γενετική τους δομή.

Η μελέτη ενός μεγαλύτερου πληθυσμιακού μεγέθους μπορεί να παρέχει ακριβέστερη γνώση της γενετικής παραλλακτικότητας και της σχέσης της με τη γεωγραφική προέλευση. Αυτές οι πληροφορίες θα μπορούσαν να είναι πολύτιμες στη διαχείριση των γενετικών πόρων στο είδος *C. graecum*, όπως περιγράφουν οι Upadhyaya et al., (2011) ένα ολοκληρωμένο σχέδιο διαχείρισης, αξιολόγησης της ποικιλομορφίας και χρησιμοποίησης όλων των ψυχανθών (οικογένεια: Fabaceae) στη βελτίωση των καλλιεργειών. Όμως, για την εξαγωγή όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων είναι απαραίτητη τόσο η διπλή ή η τριπλή επανάληψη της ίδιας πειραματικής διαδικασίας για πιστοποίηση των παρόντων αποτελεσμάτων αλλά και η ταυτόχρονη συνδυασμένη εφαρμογή άλλων ειδών μοριακών δεικτών, όπως: RAPDs, SSRs, AFLPs, SCOT.

4.2 Γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών

Η γνώση της γενετικής παραλλακτικότητας και των γενετικών σχέσεων μεταξύ των φυσικών πληθυσμών συμβάλλει στην επιτάχυνση της γενετικής

βελτίωσης των καλλιεργειών, ενώ η ταυτοποίησή της αυξάνει την αποτελεσματικότητα της δειγματοληψίας βοηθώντας στον καθορισμό προτεραιοτήτων για τα προγράμματα διατήρησης (Scipra et al., 2008). Οι ISSR δείκτες λόγω υψηλού πολυμορφισμού τους παρουσιάζουν υψηλότερη γενετική παραλλακτικότητα εντός των πληθυσμών και χαμηλότερη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών (Tang et.al., 2008). Αυτό επιβεβαιώθηκε σε μοριακή μελέτη των Rajesh et al. (2003) μεταξύ πληθυσμών ετήσιων και πολυετών άγριων ειδών *Cicer* με χρήση ISSR μοριακών δεικτών. Βάσει της AMOVA η παραλλακτικότητα μεταξύ των μελετώμενων πληθυσμών ανερχόταν στο 39,00%. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα άγρια ετήσια είδη *Cicer* δεν είναι μονοφυλετικά, μην έχοντας ίδια γενετική προέλευση από κοινό πρόγονο.

Όπως ήταν αναμενόμενο, τα παρόντα αποτελέσματα της AMOVA έδειξαν ότι το μικρότερο μέρος της διακύμανσης κατανεμήθηκε μεταξύ των πληθυσμών. Βέβαια, ήταν εξαιρετικά σημαντική φτάνοντας το 35% στην ανάλυση με τους ISSR δείκτες (Πίνακας 3.7). Αυτό είναι σε συμφωνία με το εύρημα των Jannatabadi et al., (2013) σε μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας Ιρανινών τοπικών ποικιλιών *Cicer arietinum* διαφορετικών γεωγραφικών προελεύσεων βασιζόμενη σε μορφολογικούς και STMS (Sequence tagged microsatellite markers) μοριακούς δείκτες, όπου 40% της παραλλακτικότητας εντοπίστηκε μεταξύ των ποικιλιών.

Η μέση τιμή του δείκτη ποικιλότητας Shannon ($I=0,313$) έδειξε σχετικά υψηλά επίπεδα διακύμανσης μεταξύ των πληθυσμών, η οποία τυγχάνει να είναι σε αντίθεση με την πολύ χαμηλή γενετική ποικιλομορφία ($I=0,043$) τοπικών ποικιλιών *C. arietinum* του Πακιστάν που αξιολογήθηκε με SNPs γενετικούς δείκτες από τους Sani et al., (2018). Αξιοσημείωτη είναι η παρόμοια $I=0,372$ από έρευνα των Aggarwal et al., (2015) σχετικά με αξιολόγηση γενετικής ποικιλότητας γονοτύπων *C. arietinum* και των φυλογενετικών τους σχέσεων χρησιμοποιώντας STMS μοριακούς δείκτες δείχνοντας σημαντική διαφοροποίηση των γονοτύπων.

Στην ανάλυση PCoA, στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα της μήτρας ομοιότητας για να κατασκευαστούν γραφικές παραστάσεις δύο αξόνων για κάθε συντελεστή ομοιότητας ώστε να σχηματιστούν οι αποστάσεις και οι ομαδοποιήσεις που υπήρχαν μεταξύ των δειγμάτων των πέντε φυσικών πληθυσμών. Η αναπαραστάση σε δύο αξόνες γίνεται έτσι ώστε η απόσταση των σημείων να είναι κοντά στις πραγματικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων (Mohammadi & Prassana, 2003). Η μέθοδος PCoA μεγιστοποιεί τη γραμμική συσχέτιση μεταξύ των αποστάσεων των δειγμάτων (Measures of genetic diversity, 2003). Όταν οι δύο ή οι τρεις άξονες εξηγούν το μεγαλύτερο ποσοστό της παραλλακτικότητας που υπάρχει, τότε η μέθοδος αυτή γίνεται πολύ χρήσιμη για την ομαδοποίηση των δειγμάτων σε ένα καρτεσιανό διάγραμμα. (Mohammadi & Prassana, 2003).

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα περισσότερα άτομα είναι συγκεντρωμένα σε διακριτές πληθυσμιακές ομάδες (Εικόνες 3.4 & 3.5), ενώ η εικόνα που παρουσιάζουν και τα δύο διαγράμματα των δύο αξόνων είναι σχεδόν πανομοιότυπη. Μάλιστα, υψηλότερα ποσοστά γενετικής παραλλακτικότητας εξηγήθηκαν με το συντελεστή γενετικής ομοιότητας κατά Nei (Πίνακας 3.11). Αξιοσημείωτο είναι ότι τα σημεία των γραφικών παραστάσεων (εικόνες 3.4 & 3.5)

αντιστοιχούν επαρκώς - όχι απόλυτα στις γεωγραφικές περιοχές από όπου προέρχονται (χάρτης 2.1). Ανάλογα αποτελέσματα με το παρόν πείραμα έδωσε μια ανάλυση γενετικής ποικιλομορφίας τοπικών ποικιλιών *C. arietinum* του Πακιστάν, οι οποίες διαφοροποιούνταν επαρκώς σε σχέση με τις περιοχές που αναπτύσσονται (Sani et al., 2018).

Το δενδρόγραμμα UPGMA παρουσίασε γενικά παρόμοια αποτελέσματα με την ανάλυση PCoA, επαληθευόντάς τη. Η κυρία διαπίστωση αφορά κυρίως τον ανατολικότερο πληθυσμό που μελετήθηκε (πληθυσμός 4, Χάρτης 2.1) Ο πληθυσμός 4 φαίνεται σημαντικά διαφοροποιημένος από τους υπόλοιπους της παρούσας μελέτης. Σε αντιστοιχία με το δενδρόγραμμα UPGMA η διαφοροποίηση του πληθυσμού 4 και σε μικρότερο βαθμό του πληθυσμού 3 ήταν εμφανής. Ωστόσο, ακόμη πιο ενδιαφέρουσα και διευκρινιστική με βάση τη φύση των δεδομένων των δεικτών και το υψηλό ποσοστό της γενετικής παραλλακτικότητας, θα ήταν μία επιπλέον μοριακή ανάλυση βασιζόμενη σε δείκτες SSR, δίνοντας σαφώς πιο κατατοπιστική διάκριση των σχηματιζόμενων υποομάδων στους μελετώμενους πληθυσμούς. Στην έρευνα των Naghavi et al., (2012) για αξιολόγηση γενετικής ποικιλομορφίας τοπικών ποικιλιών *C. arietinum* του Ιράν, χρησιμοποιώντας SSR μοριακούς δείκτες το αντίστοιχο δενδρόγραμμα έδειξε μικρή συσχέτιση μεταξύ της γενετικής και της γεωγραφικής ομαδοποίησης των ποικιλιών. Επιπλέον, οι ομαδοποιήσεις αυτές διέκριναν σαφώς τη βόρεια περιοχή από τις άλλες τρεις, υποδεικνύοντας φυσικό εμπόδιο ή γεωγραφικές και περιβαλλοντικές διαφορές μεταξύ αυτών των περιοχών.

Η παρουσία του μικρού έστω αριθμού αποκλειστικών αλληλομόρφων σε κάθε πληθυσμό (Πίνακας 3.6) αποδεικνύει κάποιο βαθμό ανεξαρτησίας και πιθανή σύνδεση με γονίδια προσαρμοστικού ενδιαφέροντος. Όπως προτείνουν οι Bhagyawant & Srivastava (2008), σε φυλογενετική ανάλυση γονοτύπων *C. arietinum* με ISSR μοριακούς δείκτες, οι παρατηρηθείσες μοναδικές ενισχυμένες με PCR ζώνες πιθανώς να αποδίδονται σε γενετικούς τόπους σχετιζόμενους με αντοχή σε ακραίες θερμοκρασίες. Ομοίως, οι Singh et al. (2014) σε συγκριτική μελέτη γενετικής διαφοροποίησης ανάμεσα σε άγριους και καλλιεργούμενους γονοτύπους ρεβιθιού με ISSR και RAPD μοριακούς δείκτες, συσχέτισαν τις μοναδικές ενισχυμένες ζώνες με ανθεκτικότητα έναντι μυκητολογικών προσβολών.

Οι εκτιμήσεις του δραστικού μεγέθους (N_e) του πληθυσμού) παρέχουν ένα μέτρο των συντελεστών που προκαλούν γενετική εκτροπή στους φυσικούς πληθυσμούς. Ως δραστικός αριθμός αλληλομόρφων ορίζεται ο αριθμός των ίσης συχνότητας αλληλομόρφων που συμμετέχουν εξίσου για την επίτευξη της ίδιας αναμενόμενης ετεροζυγωτίας (H) στην επόμενη γενιά του μελετώμενου πληθυσμού (Piry et al., 1999). Αυτός ο αριθμός είναι, γενικά, μικρότερος από τον πραγματικό (παρατηρούμενο) αριθμό αλληλομόρφων. Το N_e υπολογίζεται από την ανισορροπία σύνδεσης και τις μεθόδους των Wright - Fisher. Τα δραστικά μεγέθη για όλους τους μελετώμενους πληθυσμούς παρουσιάζονται σε επαρκή επίπεδα που το μέσο $N_e = 1,341$ πιθανότατα είναι αρκετό για τη σταθερότητα και την προσαρμοστική εξέλιξη τους στο μέλλον υπό το πρίσμα της κλιματικής αλλαγής. Παρόμοια αποτελέσματα ($N_e = 1,039$) αναφέρονται στην ανασκόπηση των Sani et al., (2018) περί αξιολόγησης γενετικής ποικιλομορφίας τοπικών ποικιλιών *C. arietinum* του Πακιστάν με SNPs

γενετικούς δείκτες. Οι ποικιλίες αυτές αποδείχθηκαν σταθερά προσαρμοσμένες στις περιοχές προέλευσής τους και κλιματικές ζώνες που κατατάχθηκαν.

Είναι ενδιαφέρον ότι ο πληθυσμός 4 παρουσιάζει το υψηλότερο δραστικό μέγεθος σε σύγκριση με τους υπόλοιπους υποδεικνύοντας τη γενική σταθερότητα του παρά τη σημαντική-και μάλλον ισχυρή-διαφοροποίηση του. Ο εν λόγω πληθυσμός ήταν μάλλον γενετικά απομονωμένος, χαρακτηριζόμενος από πολύ χαμηλά επίπεδα γονιδιακής ροής παρόλο που η παράμετρος αυτή δεν προσδιορίστηκε στην παρούσα μελέτη. Η εμφάνιση διάσπαρτων πληθυσμών στο *C. graecum* μπορεί να οδηγήσει σε υψηλή γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών και των περιβαλλόντων στα οποία βρίσκονται κυρίως λόγω έκθεσης του σε γενετική εκτροπή (Belletti et al., 2008). Η συχνή μείωση του μεγέθους των πληθυσμών του σπάνιου *C. graecum* μπορεί να προκαλέσει γενετική στενωπή (Belletti et al., 2008) και κατ' επέκταση να αυξηθεί περαιτέρω η γενετική εκτροπή και η διαφοροποίηση (Demesure et al., 2000). Ωστόσο οι παραπάνω διαδικασίες δεν ήταν προφανείς στην παρούσα μελέτη.

Σε εργασία των Heywood et al. (2007) περιγράφονται αναλυτικά όλα τα θέματα για την αιεφόρο διατήρηση και τη βιώσιμη χρήση μιας ομάδας ψυχανθών *Lathyrus spp* που είναι γνωστά ως κτηνοτροφικά ή καλλωπιστικά είδη στο ευρωπαϊκό και μεσογειακό κέντρο ποικιλομορφίας τους. Τα ανάλογα δύναται να εφαρμοστούν για το μελετώμενο, βοτανικά συγγενικό είδος *C. graecum*. Ωστόσο, η διατήρηση και η αιεφόρος χρήση των άγριων συγγενών των καλλιέργειων (crop wild relatives - CWRs) είναι μια πολύπλοκη διεπιστημονική διαδικασία περιλαμβάνοντας ευρύ φάσμα επιστημονικών κλάδων, τεχνικών και προσεγγίσεων οι οποίες είναι συχνά δαπανηρές και χρονοβόρες. Το ζήτημα αυτό αντιμετωπίζεται από διάφορες εθνικές ή διεθνείς πρωτοβουλίες, μεταξύ των οποίων δύο έργα του Παγκόσμιου Ταμείου για το Περιβάλλον, το χρηματοδοτούμενο από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα έργο «Αξιολόγηση και διατήρηση της ποικιλομορφίας των άγριων συγγενών των καλλιεργειών στην Ευρώπη» και το ευρωπαϊκό δίκτυο «*in situ*» και «*on farm*». Ο ορισμός του τι συνιστά CWR είναι ένα πολύπλοκο ζήτημα, ενώ προτείνεται να επεκταθεί σε οποιαδήποτε άγρια είδη άμεσης κοινωνικοοικονομικής σημασίας χρησιμοποιώντας τόσο μια γονιδιακή δεξαμενή όσο και μια ταξινομική σχέση. Λόγω των πολυαριθμών υποψήφιων άγριων ειδών ενδιαφέροντος, μια δομημένη προσέγγιση διατήρησης μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε όσα θεωρούνται υψηλής προτεραιότητας. Κατά συνέπεια, είναι κρίσιμη η διατύπωση και η εφαρμογή μηχανισμών καθορισμού προτεραιοτήτων για την ανάγκη διατήρησής τους, διευρύνοντας της σημασίας των CWR στη γεωργική ανάπτυξη, με *in situ* χαρακτηρισμό δυνητικά σημαντικών προσαρμοστικών γνωρισμάτων βασιζόμενα στην οικογεωγραφία των ειδών.

4.3 Γενικά συμπεράσματα, προτάσεις & χρησιμότητα

Η διαφοροποίηση των πληθυσμών, όπως απεικονίζεται από τις παραπάνω στατιστικές αναλύσεις, ζητά το λεπτομερή καθορισμό της δομής των πληθυσμών του φυτικού είδους *C. graecum* που παρουσιάζει διπλή σημασία: αφενός επιτρέπει τη

διαχείριση των βιότοπων του είδους και αφετέρου διευκολύνει τη δημιουργία κατάλληλου προγράμματος διατήρησης των φυσικών πληθυσμών.

Είναι σημαντική η μελέτη και η βαθμονόμηση των παραγόντων που τυχόν απειλούν με εξαφάνιση το *C. graecum* για να οριστούν οι πληθυσμοί προτεραιότητας ώστε να ενταχθούν σε ένα σύνολο *in situ* σε συνδυασμό με *ex situ* διατήρηση υπό το πρίσμα της κλιματικής αλλαγής. Όπως αναφέρεται στην έρευνα των Keisa et al. (2007) για την έμμεση αξιολόγηση της απώλειας της βιοποικιλότητας από πληθυσμούς σπάνιων και ενδημικών ειδών *Vicia spp* της Συρίας, τα οποία είναι βοτανικά συγγενή με το μελετώμενο *C. graecum* και αναπτύσσονται επίσης σε μεσογειακό κλίμα όπως της Ελλάδος, οφείλει να αξιολογηθεί η απειλή της διάβρωσης των άγριων γενετικών υλικών και να συσχετιστεί με το δημογραφικό πληθυσμό, λαμβάνοντας υπόψη τη μεταβολή του πληθυσμιακού μεγέθους τα τελευταία 20 χρόνια.

Μια σύγχρονη βελτιωτική τάση του ρεβιθιού είναι η δημιουργία νέων ανθεκτικών ευρέως προσαρμοσμένων ποικιλιών έναντι του ψύχους (Croser et al., 2010) μέσω αξιοποίησης της γενετικής παραλλακτικότητας για αυτό το χαρακτηριστικό τόσο σε καλλιεργούμενα όσο και των άγρια (ετήσια ή πολυετή) είδη *Cicer*. Αναλογιζόμενοι ότι το μελετώμενο *C. graecum* αναπτύσσεται σε ορεινό μεσογειακό κλίμα σε υψόμετρο περίπου 1000m, θα μπορούσε να συμβάλλει σε αυτό το βελτιωτικό σκοπό εφόσον εντοπιστούν γονδιακές θέσεις που σχετίζονται με το εν λόγω χαρακτηριστικό και κατανοηθούν οι φυσιολογικοί, βιοχημικοί και μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντοχή του φυτού έναντι στις χαμηλές θερμοκρασίες. Όπως προτείνουν οι Croser et al., 2010, υψηλότερη γενετική παραλλακτικότητα αναμένεται να βρεθεί σε άγρια συγγενικά είδη *Cicer* παρά στο εξημερωμένο *C. arietinum* που έχει υποστεί επιλεκτική πίεση στη διάρκεια της εξέλιξης με αποτέλεσμα την απώλεια μέρους της γενετικής του παραλλακτικότητας. Βέβαια μόνο τα *C. reticulatum* και *C. echinospermum* έχουν ευρέως κι επιτυχώς διασταυρωθεί με το καλλιεργούμενο *C. arietinum* (Singh et al., 1997). Η επιτυχία των διασταυρώσεων χρησιμοποιώντας το *C. arietinum* ως θηλυκό γονέα με τα *C. echinospermum* και *C. reticulatum* ήταν πάνω από 75%. Ωστόσο, όταν τα *C. echinospermum* και *C. reticulatum* χρησιμοποιήθηκαν ως θηλυκοί γονείς, το ποσοστό επιτυχίας ήταν χαμηλό (21% και 5%, αντίστοιχα). Ικανοποιητικά και ελπιδοφόρα αποτελέσματα έχουν δώσει τα *C. bijugum*, *C. pinnatifidum* (Singh et al., 1990) και μέτρια αποτελέσματα το *C. chorassanicum* στις κλασσικές μεθόδους, ενώ τα *C. yamashitae*, *C. cuneatum*, *C. judaicum* δεν ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικά (Singh et al., 1995).

Οι Khoury et al., 2015 αξιολόγησαν με βάση εδαφοκλιματικά και οικογεωγραφικά δεδομένα 15 άγριους συγγενείς της φάβας (*Cajanus cajan*), που είναι βοτανικά συγγενές με το υπό μελέτη είδος *C. graecum*, για την αντοχή τους σε αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης (κυρίως: υψηλές θερμοκρασίες, ψύχος, ξηρασία) και για ποιοτικά τους χαρακτηριστικά. Έχει προταθεί *ex situ* μακροπρόθεσμη διατήρηση αυτής της ποικιλομορφίας. Αναλόγως, θεωρείται αναγκαίο να εκπροσωπηθεί το αυτοφυές σπάνιο είδος *C. graecum* σε *ex situ* συστήματα διατήρησης άγριων φυτογενετικών πόρων με προτεραιότητα ώστε να

είναι άμεσα διαθέσιμο σε μελλοντικά βελτιωτικά προγράμματα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα πολυετή είδη *Cicer* είναι εξαιρετικά δύσκολο να αναπτυχθούν και να αναγεννηθούν (Malhotra et al., 2000), τότε το πολυετές μελετώμενο *C. graecum* χρειάζεται προφανώς το φυσικό του ενδιαίτημα, ενώ θα πρέπει να διατηρείται *in situ*.

Τα τωρινά αποτελέσματα αποκάλυψαν αρκετά υψηλά ποσοστά γενετικής παραλλακτικότητας με σημαντική διαφοροποίηση των πληθυσμών όπου το 65% της συνολικής παραλλακτικότητας υπάρχει μέσα στους μελετώμενους αυτοφυείς πληθυσμούς στις περιοχές που διαβιούν. Κατά γενική ομολογία, η γενετική απόσταση που προσδιορίστηκε μεταξύ των πληθυσμών από το UPGMA δένδrogramma και τα PCoA διαγράμματα φαίνεται να συμφωνεί ικανοποιητικά με τη γεωγραφική τους απόσταση, υποδεικνύοντας ότι οι πληθυσμοί δεν έχουν ή έχουν ελάχιστα εξαπλωθεί από τεχνητή παρέμβαση. Αντίθετα, μοριακές φυλογενετικές μελέτες συλλογών γενετικού υλικού του καλλιεργούμενου *C. arietinum* έδειξαν απουσία συσχέτισης της ομαδοποίησής τους με τη γεωγραφική τους προέλευση (Udupa et al., 1999, Iguela et al., 2002) υποδηλώνοντας εξάπλωση του *C. arietinum* με ανθρωπογενή παρέμβαση.

Η σημασία της ιστορικής δυναμικής εξέλιξης με βάση το κλίμα ως τον κύριο ή το μόνο παράγοντα στη διαμόρφωση της διατηρούμενης γενετικής παραλλακτικότητας και της δομής των πληθυσμών δεν είναι σαφής. Στη γεωγραφική θέση της μελέτης αυτής πιθανώς να έχει αναπτυχθεί μία πολύπλευρη αλληλεπίδραση της φύσης και του ανθρώπου αναφορικά με την εγκατάσταση των πληθυσμών, την επέκταση και τη ροή γονιδίων. Οι φυσικοί οδοί μετανάστευσης θα μπορούσαν να έχουν επηρεαστεί από τεχνητές καλλιέργειες επιλεγμένων φυτών ρεβιθιού που μπορεί σταδιακά να εξελίχθηκαν σε φυσικούς πληθυσμούς. Το τωρινό αποτέλεσμα μπορεί να είναι ένα πολύπλοκο μωσαϊκό διασωζόμενης γενετικής παραλλακτικότητας και διαφοροποίησης όπου η πρόσμειξη αυτών κατά τη διάρκεια του νέου εποικισμού μπορεί να δώσει πολύπλοκα σχήματα εξάπλωσης της γενετικής παραλλακτικότητας (Arana et al., 2010).

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αναμένεται να βοηθήσουν στην εξήγηση των γενετικών σχέσεων και της δομής των πέντε αυτοφυών πληθυσμών του άγριου συγγενικού είδους *C. graecum*. Η εύρεση διαφορετικών επιθυμητών χαρακτηριστικών στους διαφορετικούς πληθυσμούς μέσω αλληλούχισης τους και στη συνέχεια μοριακών δεικτών συνδεδεμένων με γονίδια που προσδίδουν αυτά τα χαρακτηριστικά θα ήταν πολύ χρήσιμο στην βελτίωση του ρεβιθιού, η οποία εστιάζεται στην αύξηση της απόδοσης της καλλιέργειας κυρίως με «πυραμίδωση» γονιδίων ανθεκτικότητας/ανεκτικότητας έναντι βιοτικών ή αβιοτικών παραγόντων σε elite ποικιλίες (Bharadwaj et al., 2010). Συμπερασματικά, πραγματοποιήθηκε μια ικανοποιητική μοριακή προσέγγιση του γονιδιώματος του αυτοφυούς άγριου είδους *C. graecum*. Ωστόσο, πληρέστερη εικόνα του γονιδιώματος αυτού του σπάνιου ενδημικού είδους πρέπει να ληφθεί σε συνδυασμό με συγκριτικά αποτελέσματα ανάλυσής του με άλλα είδη μοριακών, βιοχημικών ή μορφολογικών δεικτών. Χαρακτηριστικό τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η διεύρυνση της γενετικής παραλλακτικότητας 20 διαφορετικών γονοτύπων *C. arietinum* ινδικής προέλευσης με χρήση μοριακών δεικτών EST-SSR και πρωτεϊνικών δεικτών SDS-PAGE από τους

Ashwani et al., (2016), όπου τα αποτελέσματα των δύο διαφορετικών αναλύσεων αλληλοσυμπληρώνονταν για αποτύπωση των γενετικών σχέσεων μεταξύ των μελετώμενων ποικιλιών. Προτείνεται εκτενέστερη μελέτη και ανάλυση με τη χρήση μεγαλύτερου αριθμού εκκινητών που θα επιβεβαιώσει και θα ολοκληρώσει τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Βέβαια, χρειάζεται περαιτέρω κατανόηση σχετικά με το τι επηρεάζει τη γενετική δομή του είδους και πώς αυτό αλληλεπιδρά με το φαινότυπο (SmyÅkal et al., 2018) ώστε να έχουμε μελλοντικά την ευκαιρία να επιλέξουμε το κατάλληλο γενετικό υλικό από τους πληθυσμούς τους είδους για να διευρύνουμε ποικιλίες του καλλιεργούμενου *C. arietinum*, ενσωματώνοντας προσαρμοστικά χαρακτηριστικά. Οι άγριοι αυτοφυείς πληθυσμοί του πειράματος είναι υποσχόμενοι ώστε να μπορούν να στοχευθούν ως γονείς σε ευρύτερες διασταυρώσεις προς δημιουργία υβριδίων. Ωστόσο, μεγαλύτερη έμφαση απαιτείται για την ανάπτυξη *in vitro* τεχνικών (πχ: εμβρυογέννεση) που επιτρέπουν τη διασταύρωση του καλλιεργούμενου με τα άγρια είδη *Cicer* που αποτελούν πρωτογενή γενετική δεξαμενή. (Badami et al., 1997, van Dorrestein et al., 1998, Mallikajuna, 1999). Τέτοιες τεχνικές θεωρητικά θα επέτρεπαν επίσης την (τεχνητή) μεταφορά γονιδίων αγρονομικού ενδιαφέροντος από το άγριο *C. graecum* σε ποικιλίες καλλιεργούμενου ρεβυθιού. Επιθυμητά γονίδια έναντι βιοτικών ή αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης έχουν εισαχθεί στο *C. arietinum* από διασταυρώσιμα μόνο άγρια είδη *Cicer*. Βιοτεχνολογικές μέθοδοι μαζί με την ιστοκαλλιέργεια μελλοντικά αναμένεται να επιτρέψουν την εισαγωγή επιθυμητών γονιδίων από όλα τα άγρια είδη *Cicer* στο καλλιεργούμενο ρεβίθι, ξεπερνώντας τον περιορισμό της ασυμβατότητας στη διασταύρωση (Malhotra et al. 2000, Mallikarjuna et al. 2005).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ της ιστορικής χρήσης της γης και των ετερογενών περιβαλλοντικών συνθηκών (Thompson JD., 2005) και η κατανομή των βροχοπτώσεων ασκούν επιλεκτική πίεση στους άγριους πληθυσμούς της μεσογειακής βιοποικιλότητας (Berger et al., 2017). Εν κατακλείδι, η ελληνική φύση παρουσιάζει πλούτο γενετικής ποικιλομορφίας που ενδέχεται να είναι ιδιαίτερα πολύτιμος στη διατήρηση της γενετικής παραλλακτικότητας και της τοπικής προσαρμογής, ειδικά κάτω από τα σύγχρονα σενάρια κλιματικής αλλαγής, όπου η παγκόσμια γεωργική παραγωγή πρέπει να αυξηθεί αποτελεσματικά παρά τις αντίξοες μεταβλητές περιβαλλοντικές συνθήκες. Όπως αναφέρει ο Redden 2013, αυτό απαιτεί ενσωμάτωση πολλών επιστημονικών κλάδων, όπως: οικογεωγραφικές αναλύσεις των γενετικών πόρων, τη γονιδιωματική ανάλυση αυτών, την αγροοικονομία και τη διαχείριση των γεωργικών εκμεταλλεύσεων, υποστηριζόμενες από την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η κλιματική προσαρμογή των καλλιεργειών επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση γονότυπου - περιβάλλοντος.

Οι φυτογενετικοί πόροι συμβάλλουν σημαντικά στη διασφάλιση της ανθρώπινης διατροφής, την προστασίας του περιβάλλοντος και την αειφόρο ανάπτυξη. Θα πρέπει επομένως να λαμβάνεται υπόψη ότι είναι πεπερασμένοι, ενώ απειλούνται από την εισαγωγή νέων καλλιεργούμενων ποικιλιών, την αυξημένη αστικοποίηση και διάφορους φυσικούς κινδύνους (Uradhyaya at al., 2008). Καθώς διαπιστώθηκε ότι η γενετική διάβρωση δεν περιορίζεται σε μία μόνο καλλιέργεια ή

περιοχή, αλλά ότι έχει καθολικό χαρακτήρα συμπεριλαμβάνοντας τόσο ετήσια όσο και πολυετή είδη καθώς και άγριους συγγενείς των καλλιεργούμενων ειδών (Hawkes, 1983), εκφράζεται έντονη ανησυχία για αξιοσημείωτη μείωση της γενετικής παραλλακτικότητας στα νέα βελτιωμένα φυτά με περιορισμό της γενετικής τους βάσης, κάτι που δε συμφέρει την καλλιέργεια του ρεβιθιού η οποία έχει ήδη στενή γενετική βάση.

Οι άγριοι συγγενείς επιβιώνουν σε μη-καλλιεργούμενα εδάφη, σε γενικά αντίξοα περιβάλλοντα. Οι ευρύτερες γενετικές παραλλακτικότητες για την αντοχή σε αβιοτικές καταπονήσεις, ως αποτέλεσμα της φυσικής επιλογής για επιβίωση, είναι πιθανότερο να είναι διαθέσιμες σε άγρια συγγενικά είδη απ' ό,τι στις γονιδιακές δεξαμενές των περισσότερων εξημερωμένων καλλιεργειών (Ladizinsky G., 1998a , Ladizinsky G., 1998b).

Τέλος, όπως συστήνουν οι Dempewolf et al., 2014, ένα ολοκληρωμένο σχέδιο προσαρμογής των βελτιωμένων καλλιεργειών στην επερχόμενη κλιματική αλλαγή οφείλει να περιλαμβάνει:

- Εντοπισμό των απόντων άγριων συγγενικών ειδών (CWR) από τις υπάρχουσες συλλογές τραπεζών γενετικού υλικού, οι οποίοι πιθανώς να διαθέτουν αξιόλογα προσαρμοστικά χαρακτηριστικά έναντι της αλλαγής του κλίματος και απειλούνται περισσότερο.
- Συλλογή αυτών από τις φυσικές τους τοποθεσίες και διατήρησή τους σε γενετικές τράπεζες.
- Αξιολόγηση αυτών και των ήδη υπαρχόντων γενετικών υλικών CWR για χρήσιμα αγρονομικά χαρακτηριστικά και προετοιμασία τους για μετέπειτα χρήση σε βελτιωτικά προγράμματα.
- Ευρεία διαθεσιμότητα στους βελτιωτές των προϊόντα και των πληροφοριών που προκύπτουν.

5. Τελικά συμπεράσματα

- Σε επόμενο ερευνητικό στάδιο η ευρύτερη εφαρμογή μοριακών δεικτών θα βοηθήσει α) στον εντοπισμό φυτών με τα επιθυμητά γονίδια που κωδικοποιούν κάποια χαρακτηριστικά προσαρμοστικού ή αγρονομικού ενδιαφέροντος, β) στην αύξηση της συνολικής αξίας των φυτογενετικών πόρων της Ελλάδας τόσο σε εθνικό όσο και σε διεθνές επίπεδο.
- Οι μοριακοί δείκτες έχουν και άλλες δυναμικές χρήσεις στα προγράμματα βελτίωσης του ρεβιθιού, όπως ο έλεγχος ποιότητας, η κατανόηση των συστημάτων διασταυρώσεων, η κατοχύρωση και προστασία των φυτικών γενετικών υλικών. Ενώ πολλές από τις εφαρμογές δε χρησιμοποιούνται ακόμη ευρέως στην πράξη, το δυναμικό τους αναμένεται να είναι μεγάλο. Καθώς οι γονιδιωματικές τεχνολογίες εξελίσσονται, οι δαπάνες μειώνονται και η κατανόηση των μηχανισμών αυτών βελτιώνεται, θεωρείται σίγουρο ότι οι μοριακοί δείκτες θα ενσωματωθούν ως εργαλεία σε πολλές από τις φάσεις των βελτιωτικών προγραμμάτων του ρεβιθιού.
- Το *C. graecum* ως αυτογονιμοποιούμενο είδος, παρουσιάζει ελάχιστη σταυρογονιμοποίηση μεταξύ των φυσικών του πληθυσμών. Γι' αυτό

θεωρείται σπάνια η ροή γονιδίων του (gene flow) ή η γενετική του παρέκκλιση (genetic drift). Αυτά εξηγήθηκαν από τους προσδιορισμούς της παραλλακτικότητας εντός και μεταξύ των πληθυσμών.

- Με την παρούσα εφαρμογή μοριακών δεικτών ISSR μπορεί κατ' επέκταση να καταστεί δυνατός ο χαρακτηρισμός ενός αριθμού εξελικτικών δυνάμεων που επηρεάζουν τη διατήρηση της γενετικής ποικιλότητας, περιλαμβάνοντας τα συστήματα διασταυρώσεων τη ροή γονιδίων και τη γενετική εκτροπή, που δεν προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη. Τα παρόντα αποτελέσματα μπορούν να φανούν χρήσιμα στην προστασία των φυτογενετικών πόρων που αποσκοπούν στην εξασφάλιση του μακροπρόθεσμου προσαρμοστικού εξελικτικού δυναμικού του είδους. Οι υπό μελέτη πληθυσμοί μπορούν να θεωρηθούν ως πληθυσμοί υψηλής προτεραιότητας για σκοπούς διατήρησης γονιδίων που μπορεί να επιτευχθεί με τη διατήρηση μονάδων διατήρησης γονιδίων μεταξύ των φυσικών πληθυσμών που χαρακτηρίζονται από υψηλή γενετική παραλλακτικότητα και των ξεχωριστών γενετικών δεξαμενών που διαθέτουν. Η ομαδοποίηση των πληθυσμών παρέχει μία ένδειξη των ομάδων του πληθυσμού που θα πρέπει να εκπροσωπούν ένα σύστημα διατήρησης γονιδίων του άγριου είδους *C. graecum*. Συμπερασματικά, όλοι οι πληθυσμοί που μελετήθηκαν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα πρόγραμμα βελτίωσης καθώς έχουν ικανοποιητικό δραστικό μέγεθος και παρουσιάζουν σημαντικό πλούτο γενετικής παραλλακτικότητας που ενδέχεται να είναι πολύτιμος για τη διατήρηση της γενετικής ποικιλομορφίας και της τοπικής προσαρμογής ειδικά κάτω από τα σενάρια κλιματικής αλλαγής. Βέβαια είναι αναγκαία κάποια μελλοντική τους προστασία μέσω της διαχείρισης των δασών ώστε να μην κινδυνεύσουν στο άμεσο μέλλον να απολέσουν τη γενετική τους παραλλακτικότητα, ενώ θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη διατήρηση γονιδίων.
- Αποτελέσματα της τωρινής μελέτης αναμένεται να αξιοποιηθούν σε μελλοντικές έρευνες αποτελώντας κέντρο αναφοράς μέσα από καινοτόμες λύσεις για τη μελέτη και προστασία της βιοποικιλότητας σε σχέση με τις κλιματικές αλλαγές και για τις επιπτώσεις τους στην βιοποικιλότητα τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Επιπλέον, με αρχή τη μελέτη αυτή μπορεί να αρχίσει να προωθείται περαιτέρω η δικτύωση της Ελλάδας στο πεδίο της βιοποικιλότητας και κλιματικής αλλαγής, προσελκύοντας το ενδιαφέρον συνεργατών από χώρες της Ευρώπης, και όχι μόνο, με διεθνή κεφάλαια.
- Τα βελτιωτικά προγράμματα που βασίζονται σε DNA μοριακούς δείκτες παραβλέπουν μεγάλο μέρος της επιγενετικής παραλλακτικότητας. Συνεπώς, θα πρέπει να υπογραμμιστεί η σημασία της δημιουργίας μελλοντικών στρατηγικών και τεχνολογιών βελτίωσης των φυτών που λαμβάνουν υπόψη όχι μόνο τη γενετική αλλά και την επιγενετική παραλλακτικότητα.
- Θα πρέπει να ληφθούν υπόψη οι πληθυσμοί προτεραιότητας της παρούσας μελέτης ώστε να ενταχθούν σε ένα κύριο σύνολο *in situ* διατήρησης. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί σε εκείνες τις περιοχές προτεραιότητας όπου αναμένονται να είναι σε οριακές συνθήκες στα επόμενα 20 έως 30 χρόνια

λόγω της προβλεπόμενης κλιματικής αλλαγής οι πληθυσμοί που θα επιλεχθούν για *in situ* διατήρηση θα πρέπει να έχουν απογραφεί όσον αφορά στην περιοχή και τον αριθμό των ατόμων που τους αποτελούν, την αξιολόγηση της επιτυχίας αναγέννησης και του δραστικού μεγέθους του πληθυσμού, τις φαινοτυπικές παρατηρήσεις, τους βιοτικούς ή αβιοτικούς παράγοντες που επηρεάζουν την αναγέννηση και πιθανούς παράγοντες που θα μπορούσαν εν δυνάμει να απειλήσουν τους συγκεκριμένους πληθυσμούς.

- Προσπάθειες *ex situ* διατήρησης θα πρέπει να συνδυάζονται με την *in situ* διατήρηση δίνοντας προτεραιότητα στους πληθυσμούς με τη μεγαλύτερη γενετική ποικιλότητα ή στους περισσότερο απομονωμένους. Όπως προαναφέρθηκε γονιδιακοί μοριακοί δείκτες δέχεται να είναι σύντομα διαθέσιμοι εάν ταυτοποιηθούν και μελετηθούν γονίδια συνδεδεμένα με προσαρμοστικές αντιδράσεις στην αλλαγή του κλίματος.
- Η εφαρμογή των μεθόδων μοριακής βελτίωσης:
 1. Θα αυξήσει σημαντικά το επίπεδο μοριακού χαρακτηρισμού των γενετικών πόρων της Ελλάδας.
 2. Θα εξασφαλίσει την επιτυχή και βέλτιστη διατήρηση της συλλογής γενετικού υλικού.
 3. Θα αυξήσει τη διάδοση πληροφοριών σχετικά με τους Ελληνικούς φυτογενετικούς πόρους.
 4. Θα επιταχύνει και θα εντατικοποιήσει τα προγράμματα βελτίωσης του καλλιεργούμενου ρεβιθιού. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των άγριων συγγενών του ρεβιθιού θα βοηθήσει τους βελτιωτές στην ταυτοποίηση του υλικού αυτού και στην ανάπτυξη ενός μοριακού πρότυπου αναφοράς έτσι ώστε να είναι δυνατή η ταυτοποίηση οποιουδήποτε άγριου συγγενή του ρεβιθιού ανεξαρτήτως των παραγόντων που μπορούν να περιορίσουν ή να επηρεάσουν το φαινότυπο.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

1. CTAB extraction buffer.

Πρωτόκολλο για την παρασκευή του εκχυλιστικού ctab buffer που χρησιμοποιούμε στην απομόνωση DNA.

Συστατικό	Ποσότητα (για 10 mL)	Τελική συγκέντρωση
Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) (10% in H ₂ O) ^a	3 mL	3%
5 M NaCl	2.8 mL	28%
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0.4 mL	4%
1 M Tris-Cl (pH 8.0)	1 mL	10%
Polyvinylpyrrolidone (PVP) (MW 40 kDa)	0.3 g	3%
β-Mercaptoethanol	0.02 mL	0.2%
H ₂ O	2.48 mL	24.8%

Το CTAB extraction buffer θεμιτό είναι να παρασκευάζεται αμέσως πριν τη χρήση του. Δρα αποτελεσματικότερα όσο πιο φρέσκο είναι.

^aΤο 10% CTAB stock solution να αποθηκεύεται στους 37°C προς αποφυγή σχηματισμού ιζήματος. Μπορεί επίσης να αποθηκεύεται στους 37°C για μερικά χρόνια.

2. SEVAG.

Είναι μίγμα χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 24:1, το οποίο είναι τοξικό, καρκινογόνο και απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή στη χρήση του. (χειρισμός στην απαγωγό εστία) Ο διαλύτης χλωροφόρμιο απομακρύνει τις διάφορες ανεπιθύμητες ουσίες.

3. TE (T₁₀E₁) buffer.

Είναι ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης DNA. 100 ml TE περιέχουν:

1 ml από 1M Tris-HCl (Ph=8,0)

0,2 ml EDTA (0,5 M)

και δις απεσταγμένο νερό ή molecular water έως τα 100 ml.

Αποθήκευση στο ψυγείο.

4. Διαδικασία χρήσης σπεκτοφωτόμετρου Nanodrop 1000 με το λογισμικό N.D.-1000 v.3.3.1.

Στο φασματοφωτόμετρο nanodrop λαμβάνονται 3 μετρήσεις των απορροφήσεων του δείγματος στα 230 nm (αφορά πολυφαινόλες, υδατάνθρακες, EDTA), 260 nm (αφορά νουκλειικά οξέα), 280 nm (αφορά πρωτεΐνες). Γίνεται αυτόματος υπολογισμός της συγκέντρωσης νουκλειικών οξέων (ng/μl) και των λόγων Abs 260 nm/Abs 280 nm και Abs 260 nm/Abs 280 nm. Επιθυμητό είναι να έχουμε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις DNA, αλλά περισσότερο μας ενδιαφέρει ο λόγος Abs 260 nm/Abs 280 nm ο οποίος «μαρτυρά» την καθαρότητα του απομονωμένου DNA να είναι 1,8-2. Ο λόγος Abs 260 nm/Abs 230 nm να είναι τουλάχιστον 0,5. Ωστόσο, ο 2^{ος} λόγος είναι πολύ λιγότερος σημαντικός από τον 1^ο.

Από το παράθυρο εργασιών του πίνακα του λογισμικού N.D.-1000 v.3.3.1. έγινε επιλογή σε Nucleic Acids. Ο καθαρισμός της υποδοχής του οργάνου έγινε με 1 μl molecular water (Dnase free) το οποίο εμφανιζόταν σε σχετική εντολή στην οθόνη του pc που ήταν συνδεδεμένο το όργανο. Ο μηδενισμός-σταντάρισμα του οργάνου έγινε τοποθετώντας 1 μl TE buffer και πατώντας BLANK. Στη συνέχεια, 1 μl κάθε δείγματος προς μέτρηση τοποθετούνταν στην υποδοχή πατώντας measure και καταγράφοντας την ένδειξη. Κάθε φορά γινόταν καθαρισμός της υποδοχής προς αποφυγή πρόσμειξης με άλλο δείγμα και συνεπώς αλλοίωσης του αποτελέσματος. Γινόταν διπλή επανάληψη της μέτρησης για την αξιοπιστία του αποτελέσματος. Στο τέλος, πατώντας exit program γινόταν πάλι καθαρισμός της υποδοχής του οργάνου με molecular water (Dnase free).

5. Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος 0,5 X TBE για χρήση του σε πηκτική αгарόζης και διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Το ρυθμιστικό διάλυμα 0,5 X TBE προκύπτει από αραιώση του πυκνού διαλύματος 5 X TBE. Για παρασκευή 1 L διαλύματος 5 X TBE (pH 8) ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 54 gr Tris base (FW= 121,14) και 27,5 gr boric acid τα οποία αναμείχθηκαν και διαλύθηκαν πλήρως με ανάδευση σε αποστειρωμένο μαγνητικό αναδευτήρα σε 900 ml απεσταγμένο - αποστειρωμένο νερό. Έπειτα προστέθηκαν 20 ml έτοιμου παρασκευασμένου διαλύματος 0,5 M EDTA (pH 8), έγινε συμπλήρωση με 80 ml απεσταγμένο - αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1 L και έλεγχος του pH=8.

Το διάλυμα αυτό φυλάχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου σε γυάλινο ογκομετρικό μπουκάλι χωρίς, όμως, να παλαιώσει ώστε να αποφευχθεί σχηματισμός ιζήματος. Για το λόγο αυτό, το πυκνό διάλυμα TBE προτιμάται να παρασκευάζεται γενικά, σε συγκέντρωση έως 5 X παρά σε 10 X ή μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Επίσης, το χρησιμοποιημένο διάλυμα 0,5 X TBE δύναται να επαναχρησιμοποιηθεί έως 2-3 επιπλέον φορές, διατηρώντας έως εκεί την ηλεκτροφορητική του ικανότητα.

6. Υπολογιστικοί τύποι

N_a = No. of Different Alleles

N_e = No. of Effective Alleles = $1 / (p^2 + q^2)$

I = Shannon's Information Index = $-1 * (p * \ln(p) + q * \ln(q))$

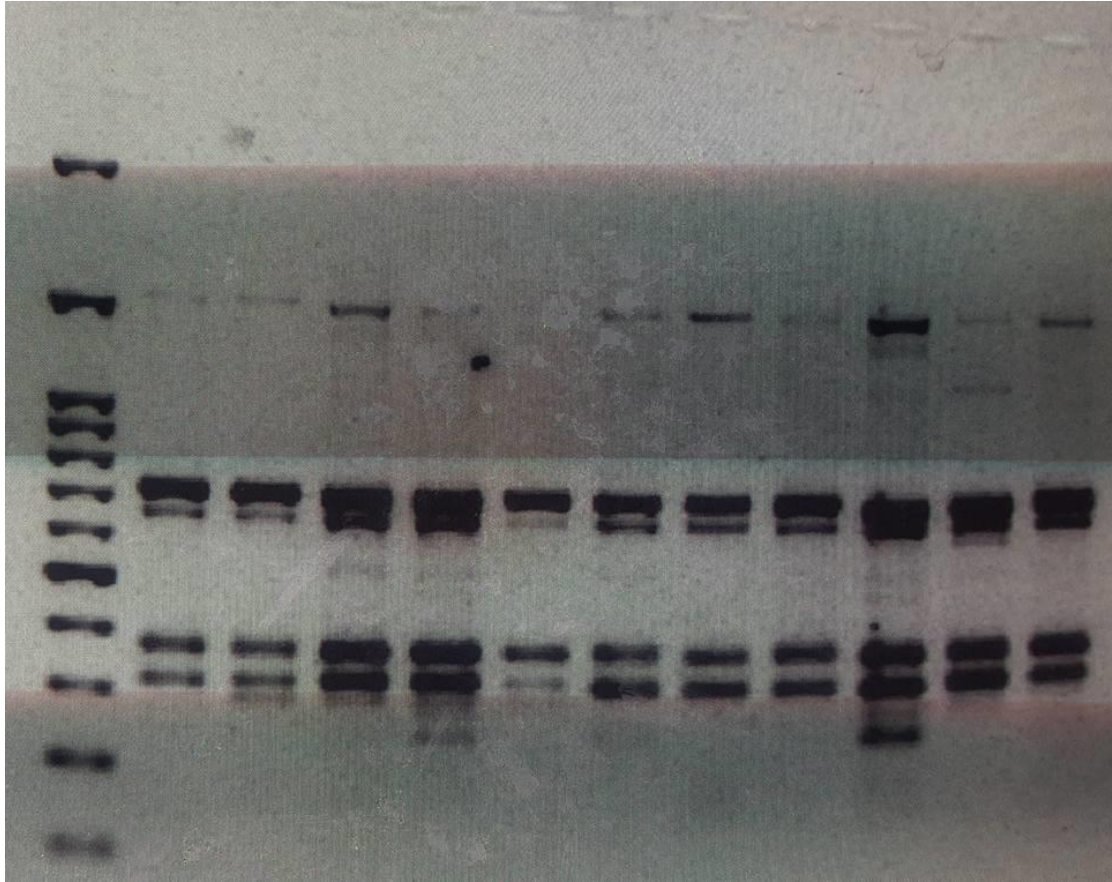
h = Diversity = $1 - (p^2 + q^2)$

u_h = Unbiased Diversity = $(N / (N-1)) * h$

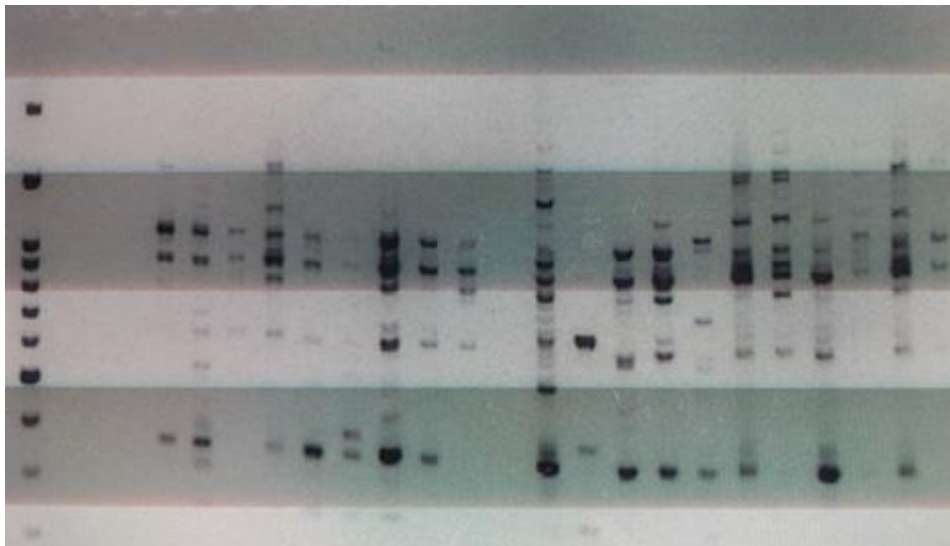
Where for Haploid Binary data, p = Band Freq. and $q = 1 - p$.

Nei Genetic Identity = $J_x J_y / (J_x * J_y)^{0.5}$. Nei Unbiased Genetic Identity = $J_{xy} / (J_{xUb} * J_{yUb})^{0.5}$

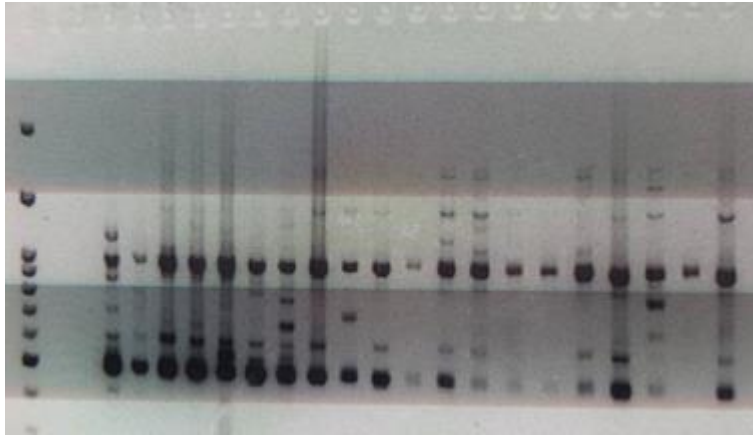
7. Χαρακτηριστικές εικόνες των ενισχυμένων ζωνών DNA σε πληθυσμούς του *C. graecum* με όλους τους εκκινητές του πειράματος.



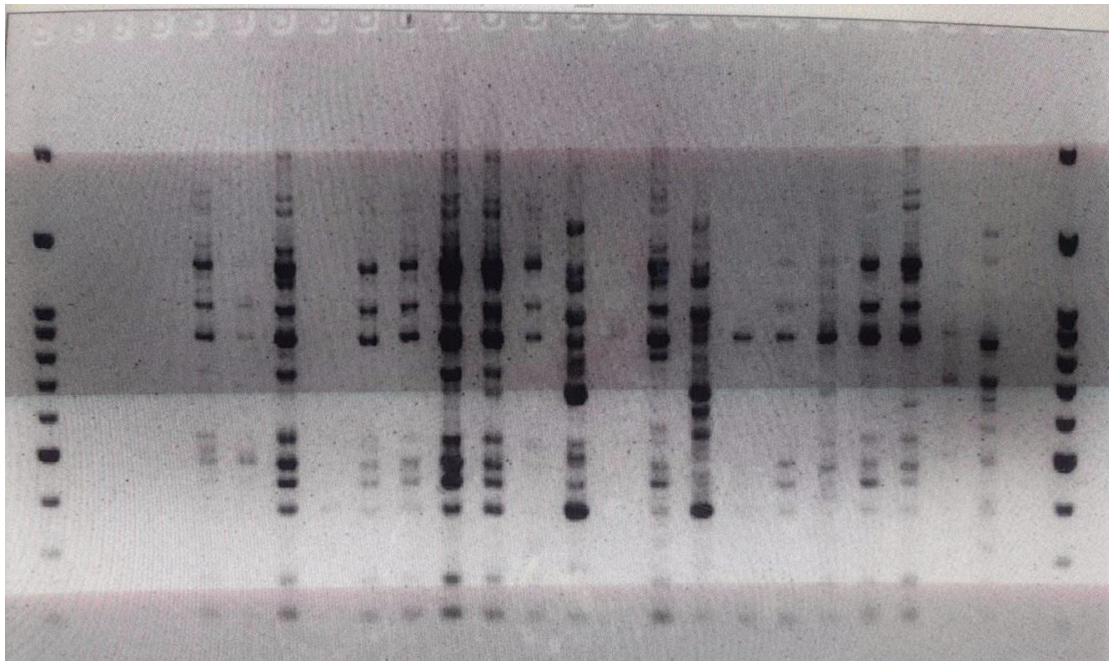
Εικόνα Π1. Διαχωρισμός ορισμένων PCR προϊόντων του 5^{ου} μελετώμενου πληθυσμού, ενισχυμένων με τον 807 ISSR εκκινητή.



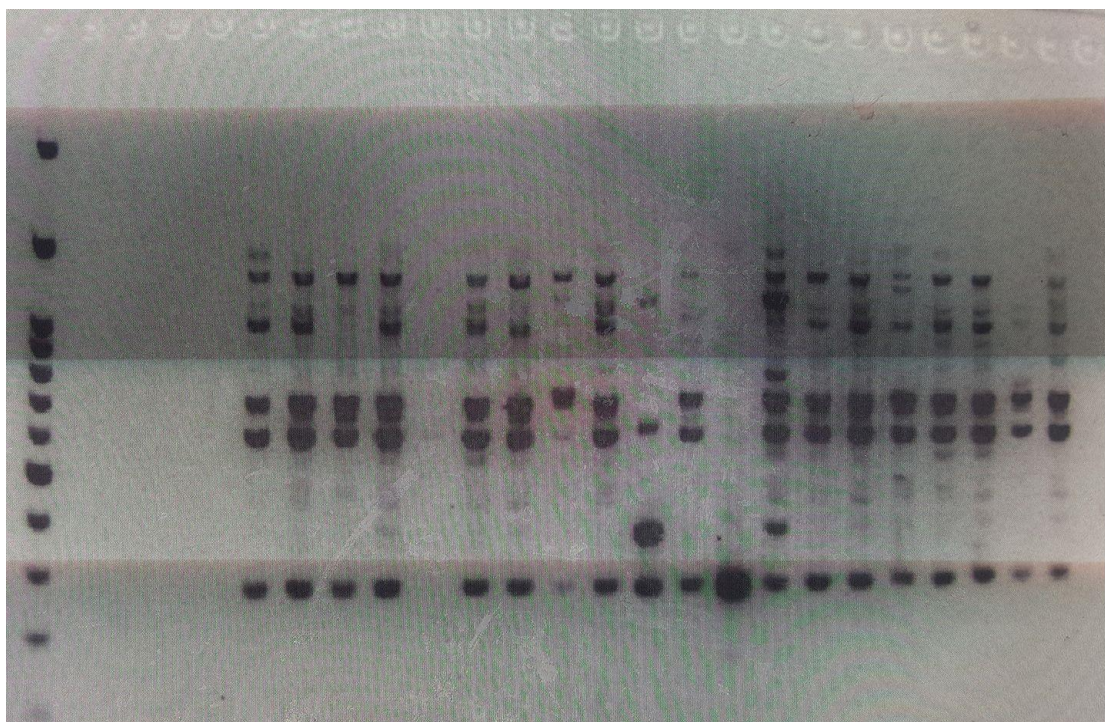
Εικόνα Π2. Διαχωρισμός PCR προϊόντων του 1^{ου} μελετώμενου πληθυσμού, ενισχυμένων με τον 811 ISSR εκκινητή.



Εικόνα Π3. Διαχωρισμός pcr προϊόντων του 5^{ου} μελετώμενου πληθυσμού, ενισχυμένων με τον 818 ISSR εκκινητή.



Εικόνα Π4. Διαχωρισμός pcr προϊόντων του 2^{ου} μελετώμενου πληθυσμού, ενισχυμένων με τον 826 ISSR εκκινητή.



Εικόνα Π5. Διαχωρισμός pcr προϊόντων του 2^{ου} μελετώμενου πληθυσμού, ενισχυμένων με τον 841 ISSR εκκινητή.

8. Χαρακτηριστικές εικόνες των αυτοφυών πληθυσμών του *C. graecum* στο φυσικό περιβάλλον ανάπτυξής τους.











9. Μετρήσεις καθαρότητας και ποσοτικοποίηση DNA με τη χρήση φασματοφωτόμετρου.

Πίνακας Π.1. Μετρήσεις καθαρότητας και ποσοτικοποίηση των αρχικών απομονωμένων DNA όλων των μελετώμενων φυτικών δειγμάτων *C. graecum*.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ng/μl)	ΛΟΓΟΣ ΑΠΟΡΟΦΗΣΗΣ (260 nm/280 nm)	ΛΟΓΟΣ ΑΠΟΡΟΦΗΣΗΣ (260 nm/230 nm)
1	154,2	2	2,4
2	260,9	2,07	1,81
3	228,7	2,05	2,31
4	292,6	1,95	1,48
5	146,8	2,16	1,62
6	325,8	2,01	2,03
7	322	2	1,91
8	197,1	2,03	2,02
9	236,2	2,07	2,1
10	194,4	1,95	1,71
11	128,7	1,93	1,88
12	419,4	1,9	1,75
13	216,5	1,97	1,81
14	449,6	1,89	1,66
15	110,8	2,02	2,25
16	237	2,12	2,07
17	242,4	1,97	2,05
18	48,9	1,9	1,67

19	100,1	1,91	1,88
20	108,1	1,93	1,87
21	405,6	1,98	1,99
22	70,6	1,79	2,21
23	82,7	2,04	2,59
24	47,1	1,86	2,14
25	94,9	1,79	2,65
26	161	1,72	1,06
27	108	1,84	2,39
28	65,4	1,98	2,27
29	401,9	1,94	2,34
30	152,5	1,91	2,7
31	85,5	1,72	2,85
32	510,2	1,81	1,54
33	438	1,87	1,73
34	488,9	1,93	2,3
35	240,3	1,97	1,99
36	479,3	1,9	1,89
37	199	1,61	91
38	107,7	1,87	2,07
39	47,1	1,77	1,35
40	187,5	1,48	0,71

41	110	1,87	2,15
42	117,9	1,99	1,9
43	239,8	1,96	1,97
44	355,6	1,94	1,95
45	232,9	1,91	1,62
46	337,6	1,99	1,9
47	193,1	2	1,99
48	268,9	1,99	1,91
49	83,5	1,92	2,05
50	149,4	1,85	1,56
51	223,1	1,96	1,86
52	98,9	2	1,66
53	288,7	2,04	2,1
54	236,4	2,02	1,96
55	195,8	1,96	1,78
56	297,6	1,88	1,55
57	42,9	2,02	2,05
58	85,5	1,86	1,52
59	247,9	1,9	1,57
60	85	1,94	1,26
61	108,1	2,09	1,61
62	213,1	1,48	0,78
63	173,2	1,72	1,21

64	321,7	1,94	1,87
65	294,9	1,68	1,01
66	176,5	1,91	1,43
67	63,4	1,77	1,65
68	273,3	1,96	1,6
69	72,9	1,82	2,2
70	90	1,67	1,33
71	107,5	1,54	0,89
72	76,4	2,08	1,35
73	92,1	1,88	2,41
74	90,4	1,61	1,07
75	232,7	1,95	1,46
76	423,2	1,97	1,89
77	154	1,74	1,19
78	380,8	2,12	2,02
79	260,2	2,09	1,75
80	154,8	2,05	1,6
81	242,1	1,99	1,72
82	16,6	2,2	0,61
83	241,5	1,81	1,16
84	102,1	2,08	1,36
85	31	1,73	0,65
86	961,4	1,98	1,48

87	89,9	1,62	0,98
88	102,2	1,64	1,04
89	46,3	2,12	0,81
90	125,5	2,1	1,36
91	247,6	2,14	1,67
92	288,9	2,11	2,07
93	204,6	1,73	1,09
94	118,7	1,37	0,67
95	108,7	1,69	1,25
96	57,3	1,55	1,1
97	105,9	1,94	1,37

Πίνακας Π.2. Μετρήσεις καθαρότητας και ποσοτικοποίηση των τελικών καθαρισμένων DNA όλων των μελετώμενων φυτικών δειγμάτων *C. graecum*.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ng/μl)	ΛΟΓΟΣ ΑΠΟΡΟΦΗΣΗΣ (260 nm/280 nm)	ΛΟΓΟΣ ΑΠΟΡΟΦΗΣΗΣ (260 nm/230 nm)
1	234,7	1,87	1,44
2	202,3	1,8	1,61
3	326,1	1,89	1,61
4	355,5	1,79	1,55
5	154,9	1,84	1,58
6	263,6	1,9	1,97
7	250,2	1,85	1,74

8	218,7	1,7	1,01
9	325,4	1,95	2,27
10	156,6	1,71	1,05
11	148,8	1,61	0,84
12	369,2	1,88	1,95
13	167,8	1,76	1,24
14	147,3	1,77	1,47
15	230,6	1,77	1,3
16	167,7	1,87	1,91
17	135,8	1,88	2,06
18	60,1	1,53	0,67
19	75,4	1,68	1,18
20	172,8	1,8	1,49
21	297,3	1,84	1,62
22	99,4	1,61	1,03
23	271,2	1,87	1,83
24	121,2	1,71	1,38
25	76	1,62	1,03
26	80,1	1,52	0,55
27	92,3	1,53	0,78
28	163,8	1,71	1,55
29	261,8	1,75	1,34

30	279,3	1,79	1,48
31	104,8	1,65	1,19
32	422	1,74	1,26
33	219,9	1,76	1,57
34	384,5	1,76	1,5
35	240,3	1,97	1,99
36	479,3	1,9	1,89
37	199	1,61	0,91
38	107,7	1,87	2,07
39	101,1	1,55	0,9
40	187,5	1,48	0,71
41	110	1,87	2,15
42	116,7	1,54	0,61
43	256,8	1,79	1,2
44	205,3	1,51	0,6
45	420,4	1,6	1,03
46	293,6	1,82	1,35
47	238,6	1,79	1,2
48	289,8	1,72	1,06
49	45,4	1,79	2,18
50	143,8	1,79	1,11
51	193,7	1,77	1,12

52	111,9	1,54	0,64
53	318,9	1,82	1,3
54	406	1,94	1,97
55	179,3	1,72	0,95
56	158,1	1,73	0,99
57	240,6	1,87	1,75
58	115,1	1,6	0,76
59	121,5	1,61	0,75
60	191,2	1,73	0,99
61	562,1	1,87	0,67
62	241,6	1,45	0,72
63	178,1	1,65	1,11
64	323,1	1,88	1,82
65	205,5	1,66	0,97
66	215,2	1,85	1,47
67	181,9	1,77	1,21
68	150,5	1,89	1,38
69	129,6	1,72	1,32
70	256,5	1,77	1,41
71	186,1	1,57	0,9
72	86,1	1,83	82
73	196,8	1,84	1,86

74	200,3	1,64	0,96
75	202,8	1,9	1,53
76	239,8	1,9	2,06
77	206,5	1,71	1,23
78	669,6	1,96	1,9
79	422,4	1,9	1,72
80	332,3	1,86	1,53
81	566,8	1,74	1,45
82	123,1	1,64	1,2
83	390,2	1,71	1,25
84	414,7	1,8	1,37
85	82,6	1,84	1,36
86	177,4	1,9	1,57
87	214,4	1,71	1,24
88	281,4	1,78	1,22
89	91,3	2,08	1,4
90	805,1	2,14	1,67
91	1355,7	2	1,91
92	438,5	1,93	2
93	162,7	1,62	0,91
94	148,3	1,6	0,86
95	399,1	1,81	1,21

96	158,1	1,56	0,84
97	134,1	1,79	1,11

Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

Abbo S., Berger J. and Turner N.C. 2003. Evaluation of Cultivated Chickpea: Four Bottlenecks Limit Diversity and Constrain Adaptation. *Functional Plant Biology*, **30**, 1081-1087.

Agrawal P.K. and Srivastava A. 2010. Assessment of genetic Diversity among Chickpea Cultivars of India Using RAPD Marker. *Indian Journal of Human Genetics*, **70**, 264-270.

Agrawal Himansu, Rao Alka, Kumar Anil, Singh Jasbir, Rana Jogender Singh, Naik Pradeep Kumar, Chhokar Vinod. 2015. Assessment of genetic diversity among 125 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) of Indian origin using ISSR markers. *Turkish Journal of Botany. Turk J Bot* (2015) **39**: 218-226 TUBİTAK doi:10.3906/bot-1401-80.

Ashwani Kumar, Sorabh Chaudhary, Sushma Sagar, Vinay Kumar and Mukesh Kumar. 2016. Assessment of genetic diversity among Chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes using EST-SSR markers and SDS-PAGE. Vol. 11 (4) April (2016) *Res. J. Biotech*.

Ahmad F. 1999. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis reveals genetic relationships among the annual *Cicer* species. *Theoretical and Applied Genetics* **98**: 657–66.

Ahmad F., Gaur P.M., Slinkard AE. 1992. Isozyme polymorphism and phylogenetic interpretations in the genus *Cicer* L. *Theoretical and Applied Genetics* **83**: 620–627.

Ahmad F., Khan, A.I., Awan, F.S., Sadia, B., Sadaqat, H.A. and Bahadur, S. 2010. Genetic Diversity of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Germplasm in Pakistan as Revealed by RAPD Analysis. *Genetics and Molecular Research*, **9**, 1414-1420.
<http://dx.doi.org/10.4238/vol9-3gmr862>

Akagi H., Yokozeki Y., Inagaki, A., Nakamura, A., & Fujimura, T. 1996. A codominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, Rf-1, identified with inter-SSR fingerprinting. *Genome*, **39**(6), 1205-1209.

Andersen J. R., & Lubberstedt T. 2003. Functional markers in plants. *Trends in plant science*, **8**(11), 554-560.

Arana M. V., Gallo L. A., Vendramin G. G., Pastorino M. J., Sebastiani F. and Marchelli P. 2010. High genetic variation in marginal fragmented populations at

extreme climatic conditions of the Patagonian Cypress *Austrocedrus chilensis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54(3):941-949.

Avise JC. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Badami PS, Mallikarjuna N, Moss J. 1997. Interspecific hybridization between *Cicer arietinum* and *C. pinnatifidum*. *Plant Breed* 116:393–395

Barbero M. & Quezel P. 1976. Les groupements forestiers de Grece Centro-Meridionale. *Ecologia Mediterranea* 2: 1-86.

Bahl PN. 1980. Kabuli-Desi introgression and the genesis of a new plant type of chickpea. In: Green JM, Nene YL, Smithson JB (eds) *Proc Int Workshop on Chickpea Improvement*, ICRISAT, Hyderabad, India, pp 75–80.

Belletti, P., Monteleone, I. and Ferrazzini, D. 2008. A population genetic study in a scattered forest species, wild service tree [*Sorbus torminalis* (L.) Crantz], using RAPD markers. *European Journal of Forest Research* 127(2):103-114.

Berger JD, Shrestha D, Ludwig C. 2017. Reproductive strategies in Mediterranean legumes: Trade-offs between phenology, seed size and vigor within and between wild and domesticated *Lupinus* species collected along aridity gradients. *Front Plant Sci.* 2017; 8: e548.

Bhagyawan S. S. & Srivastava N. 2008. Genetic fingerprinting of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm using ISSR markers and their relationships. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (24), pp. 4428-4431, 17 December, 2008. ISSN 1684–5315 2008 Academic Journals <http://www.academicjournals.org/AJB>

Bharadwaj C, Chauhan SK, Rajguru G, Srivastava R, Satyavathi CT, Yadav S, Rizvi AH, Kumar J, Solanki RK. 2010. Diversity analysis of chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars using STMS markers. *Indian J. Agric. Sci.* 80(11):947-951.

Boshier, D. and Amaral, W. 2004. Threats to forest ecosystems and challenges for the conservation and sustainable use of forest genetic resources. In: Vinceti B, Amaral W, Meilleur B (eds) *Challenges in managing forest genetic resources for livelihoods* IPGRI, Rome:7-22.

Choudhary P, Khanna SM, Jain PK, Bharadwaj C, Pramesh JK et al. 2013. Molecular Characterization of Primary Gene Pool of Chickpea Based on ISSR Markers. *Biochem Genet* 51: 306-322. Citation: Gautam

Collard, B.C.Y., Ades, P.K., Pang, E.C.K., Brouwer, J.B. and Taylor, P.W.J. 2001. Prospecting for sources of resistance to ascochyta blight in wild *Cicer* species. *Aust. Plant Pathol.* 30, 271–276.

Collard, B. C. Y., & Mackill, D. J. 2009. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27(1), 86-93.

- Contandriopoulos, J., Pamukcuoglou, A. & Quezel, P. 1972.** A propos de *Cicer vivaces* du pourtour mediteraneen oriental. *Biol. Gallo-Hellen.* 4(1): 3-18.
- Cooper H.D., Spillane C., Hodgkin T. 2000.** Broadening the genetic base of crops: an overview. In: Cooper H.D., Spillane C., Hodgkin T. (Eds.), *Broadening the Genetic Base of Crop Production*. CABI Publishing, New York, NY, USA, pp. 1-23.
- Cracraft J. 1986.** Origin and evolution of continental biotas: speciation and historical congruence within the Australian avifauna. *Evolution* 40: 977–996.
- Croser J.S., Ahmad F, Clarke H.J. & Siddique K.H.M. 2003.** Utilisation of wild *Cicer* in chickpea improvement — progress, constraints, and prospects. *Australian Journal of Agricultural Research* 54(5) 429 – 444.
- Croser J. S., Clarke H.J., Siddique K.H.M. & Khan T.N. 2010.** Low- Temperature Stress: Implications for Chickpea (*Cicer arietinum L.*) Improvement, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22:2, 185-219, DOI: 10.1080/713610855. <https://doi.org/10.1080/713610855>
- Demesure, B., Guerroun, B. L., Lucchi, G., Prat, D. and Petit, R.-J. 2000.** Genetic variability of a scattered temperate forest tree: *Sorbus torminalis* L. (Crantz). *Ann For Sci* 57(1):63-71.
- Dempewolf Hannes, Eastwood Ruth J., Guarino Luigi, Khoury Colin K., Müller Jonas V. & Toll Jane. 2014.** Adapting Agriculture to Climate Change: A Global Initiative to Collect, Conserve, and Use Crop Wild Relatives. Pages 369-377 . Published online: 18 Feb . <https://doi.org/10.1080/21683565.2013.870629>
- Dimopoulos, P. 1993.** Floristic and phytosociological research of Mount Killini. An ecological approach. PhD. Thesis, Patras.
- Doyle, J. J. & J. L. Doyle. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Fang, D.Q., & Roose, M.L. 1997.** Identification of closely related citrus cultivars with intersimple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(3), 408-417.
- Frediani M, Caputo P. 2005.** Phylogenetic relationships among annual and perennial species of the genus *Cicer* as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Biologia Plantarum* 49: 47–52.
- Gautam A.K., Gupta N., Bhadkariya R., Srivastava N. and Bhagyawant S.S. 2016.** Genetic Diversity Analysis in Chickpea Employing ISSR Markers. *Agrotechnology* 2016, 5:2 DOI: 10.4172/2168-9881.1000152
- Gil J, Cubero JL. 1993.** Inheritance of seed coat thickness in chickpea (*Cicer arietinum L.*) and its evolutionary implications. *Plant Breed* 111:257–260

- Gupta M., Chyi Y. S., Romero-Severson, J., & Owen, J. L. 1994.** Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 89(7-8), 998-1006.
- Gupta, P. K., & Rustgi, S. 2004.** Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Functional & integrative genomics*, 4(3), 139-162.
- Harlan J.R. 1992.** Landrace populations in Space, Time and Variation, Crops and Man, Second edition, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 147-149.
- Hawkes J.G. 1983.** The diversity of crop plants. Harvard University Press, Cambridge, pp. 101-107.
- Hawtin GC, Singh KB. 1980.** Kabuli-Desi introgression: problems and prospects. In: Green JM, Nene YL, Smithson JB (eds) Proc Int Workshop on Chickpea Improvement, ICRIAT, Hyderabad, India, pp 51–60.
- Heywood Vernon, Casas Alejandro, Ford-Lloyd Brian, Kell Shelagh, Maxted Nigel. 2007.** Conservation and sustainable use of crop wild relatives. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 121 (2007) 245–255. www.elsevier.com/locate/agee
- Holland, J. B., Helland, S. J., Sharopova, N., & Rhyne, D. C. 2001.** Polymorphism of PCRbased markers targeting exons, introns, promoter regions, and SSRs in maize and introns and repeat sequences in oat. *Genome*, 44(6), 1065-1076.
- Hoz, M. P. S. d. l., Davila, J. A., Loarce, Y., & Ferrer, E. 1996.** Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. *Genome*, 39(1), 112-117.
- Iruela M, Rubio J, Cubero JJ, Gil J, Millan T. 2002.** Phylogenetic analyses in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 643–651.
- Jamil, F.F., Sarwar, M., Sarwar, N., Khan, J.A., Zahid, M.H., Yousaf, S., Arshad, H.M.I. and Haq, I.U. 2010.** Genotyping with RAPD Markers Resolves Pathotype Diversity in the *Ascochyta blight* and *Fusarium wilt* Pathogen of Chickpea in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 42, 1369-1378.
- Javadi F, Yamaguchi H. 2004a.** Interspecific relationships of the genus *Cicer* L. (Fabaceae) based on *trnT-F* sequences. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 317–322.
- Javadi F, Yamaguchi H. 2004b.** RAPD and seed coat morphology variation in annual and perennial species of the genus *Cicer* L. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 783–794.
- Joshi, S. P., Gupta, V. S., Aggarwal, R. K., Ranjekar, P. K., & Brar, D. S. 2000.** Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence

repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(8), 1311- 1320.

Karp, A., Seberg, O. L. E. and Buiatti, M. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany* 78(2):143-149.

Kazan K, Muehlbauer FJ. 1991. Allozyme variation and phylogeny in annual species of *Cicer* (Leguminosae). *Plant Systematics and Evolution* 175: 11–21.

Keis'a Anete, Maxted Nigel & Ford-Lloyd Brian. 2007. The assessment of biodiversity loss over time: wild legumes in Syria. *Genet Resour Crop Evol* (2008) 55:603–612 DOI 10.1007/s10722-007-9264-z

Khoury Colin K., Castapeda-Alvarez Nora P., Achicanoy Harold A., Sosa Chrystian C., Bernau Vivian, Kassa Mulualem T., Norton Sally L., van der Maesen L. Jos G, Upadhyaya Hari D., Ramvrez-Villegas Julian, Jarvis Andy, Struik Paul C. 2015. Crop wild relatives of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]: Distributions, ex situ conservation status, and potential genetic resources for abiotic stress tolerance. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2015.01.0320006-3207> 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd.

Kojima, T., Nagaoka, T., Noda, K., & Ogihara, Y. 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(1), 37-45.

Labdi M, Robertson LD, Singh KB, Charrier A. 1996. Genetic diversity and phylogenetic relationships among the annual *Cicer* species as revealed by isozyme polymorphism. *Euphytica* 88: 181–188

Ladizinsky G, Adler A. 1975. The origin of chickpea as indicated by seed protein electrophoresis. *Israel J Bot* 24:183–189

Ladizinsky G, Adler A. 1976a. Genetic relationships among the annual species of *Cicer* L. *Theor Appl Genet* 48:197–203

Ladizinsky G, Adler A. 1976b. The origin of chickpea *Cicer arietinum* L. *Euphytica* 88:181–188

Ladizinsky, G. 1998a. Origins of Agriculture. In *Plant Evolution under Domestication*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, Chapter 1; pp. 1–60

Ladizinsky, G. 1998b. Genetic Resources for Future Crop Evolution. In *Plant Evolution under Domestication*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, Chapter 7; pp. 209–222.

Maged Mahmoud Abou-El-enain & Shawkat Mahmoud Ahmed. 2012. Intraspecific diversity of Egyptian and foreign new lines of chickpea based on Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and isozyme

markers. Department of Biological and Geological Sciences, Faculty of Education, Ain Shams University, Roxy, Heliopolis, P. C. 11341, Cairo, Egypt.

Mallikajuna, N. 1999. Ovule and embryo culture to obtain hybrids from interspecific incompatible pollinations in chickpea. *Euphytica* 110, 1–6.

Mallikarjuna N., D. Jadhav, H. Clarke, C. Coyne, and F. Muehlbauer, 2005. Induction of androgenesis as a consequence of wide crossing in chickpea. *ICPN* 12: 2-15.

Malhotra, R S and Pundir, R P S and Kaiser, W J. 2000. Cicer species - Conserved Resources, Priorities for Collection and Future Prospects. In: Linking Research and Marketing Opportunities for Pulses in the 21st Century. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 603-611. ISBN 0-7923-5565-2.

Meyer, W., Mitchell, T. G., Freedman, E. Z., & Vilgalys, R. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(9), 2274-2280.

Mohammadi S.A., Prassana B.M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants - salient statistical tools and consideration. *Cropscience* 43: 1235-1248.

Moreno MT, Cubero JJ. 1978. Variation in *Cicer arietinum* L. *Euphytica* 27:465–468

Moreno, S., Martin, J. P., & Ortiz, J. M. 1998. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica*, 101(1), 117-125.

Naghavi Mohammad Reza, Monfared Sajad Rashidi & Humberto Gomez. 2012. Genetic Diversity in Iranian Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Landraces as Revealed by Microsatellite Markers. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 48, 2012 (3): 131–138.

Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics* 89:583-590.

Nisar Mohammad, Ghafoor A., Rashid Khan M., Ahmad Habib, Qureshi Afsari Sharif and Ali Haidar. 2007. Genetic diversity and geographical relationship Among local and exotic chickpea germplasm. *Pak. J. Bot.*, 39(5): 1575-1581, 2007.

Ocampo B, Venora G, Errico A, Singh KB, Saccardo F. 1992. Karyotype analysis in the genus *Cicer*. *J Genet Breed* 46: 229–240

Ohri D, Pal M. 1991. The origin of chickpea (*Cicer arietinum* L.): karyotype and nuclear DNA amount. *Heredity* 66:367–372

Pakseresht, F., Talebi, R. & Karami, E. 2013. Comparative Assessment of ISSR, DAMD and SCoT Markers for Evaluation of Genetic Diversity and Conservation of Landrace Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genotypes Collected from North-West of Iran. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19, 563-574.

Piry S., Luikart G. & Cornuet J-M. 1999. BOTTLENECK: A Computer Program for Detecting Recent Reductions in the Effective Population Size Using Allele Frequency Data. Corresponding Editor: Robert Angus.

Polhill RM. 1981. Papilionoideae. In: Polhill RM, Raven PH, eds. *Advances in legume systematics*, Part 1. Kew: Royal Botanic Gardens, 191–208.

Popov MG. 1929. The genus *Cicer* and its species. *Bulletin of Applied Botany, Genetic and Plant Breeding* **21**: 1–254.

Rajesh PN, Sant VJ, Gupta VS, Muehlbauer FJ, Ranjekarn PK. 2003. Genetic relationships among annual and perennial wild species of *Cicer* using inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism. *Euphytica* **129**: 15–23.

Rao L., Usha R.P., Deshmukh P., Kumar P. & Panguluri S. 2007. RAPD and ISSR Finger-Printing in Cultivated Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Its Wild Progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **54**, 1235-1244. <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-006-9104-6>

Ratnaparkhe MB, Santra DK, Tullu A, Muehlbauer FJ. 1998a. Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea. *Theor Appl Genet* 96:348–353.

Ratnaparkhe MB, Tekeoglu M, Muehlbauer FJ. 1998b. Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theor Appl Genet* 97:515–519.

Redden R. 2013. New Approaches for Crop Genetic Adaptation to the Abiotic Stresses Predicted with Climate Change. *Agronomy* 2013, 3, 419-432.

Reddy, M. P., Sarla, N., & Siddiq, E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1), 9-17.

Renganayaki K, Read JC, Fritz AK. 2001. Genetic diversity among Texas bluegrass (*Poa arachnifera* torr.) revealed by AFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet* 102: 1037-1045.

Salimath PM, Bahl PN, Mehra RB. 1984. Genetic diversity in chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Z Pflanzenzüchtg* 92:52–60

Sankar, A. A., & Moore, G. A. 2001. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(2-3), 206-214.

Sant VJ, Patankar AG, Sarode ND, Mhase LB, Sainani MN, Deshmukh RB, Ranjekar PK, Gupta VS 1999. Potential of DNA markers in detecting divergence and in analysing heterosis in Indian elite chickpea cultivars. *Theor Appl Genet* 98: 1217–1225

Santiago CRA, Moreira-Araújo RSR, Pinto de Silva MEM, Arêas JAG 2001. The potential of extruded chickpea, corn and bovine lung for malnutrition programs. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2: 203-209.

Schierwater, B., & Ender, A. 1993. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic acids research*, 21(19), 4647-4648.

Scippa G.S., Trupiano D., Rocco M., Viscosi V., Di Michele M., D'Andrea A., Chiatane D. 2008. An integrated approach to the characterization of two autochthonous lentil (*Lens culinaris*) landraces of Molise (south-central Italy). *Heredity* 101: 136-144.

Sethy NK, Choudhary S, Shokeen B, Bhatia S. 2006. Identification of microsatellite markers from *Cicer reticulatum*: molecular variation and phylogenetic analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 347–357.

Serret MD, Udupa SM, Weigand F. 1997. Assessment of genetic diversity of cultivated chickpea using microsatellite-derived RFLP markers: implications for origin. *Plant Breed* 116: 573–578

Sharma PC, Winter P, Bünger T, Hüttel B, Weigand F, Weising K, Kahl G. 1995. Abundance and polymorphism of di-, tri-, and tetra- nucleotide tandem repeats in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theor Appl Genet* 90:90–96

Sharma H.C., Pampapath ,G., Lanka S.K. & Ridsdill Smith T.J.2005. Exploitation of wild *Cicer reticulatum* germplasm for resistance to *Helicoverpa armigera*. *J. Econ. Entomol.* 98, 2246–2253.

Simon CJ, Muehlbauer FJ 1997. Construction of chickpea linkage map and its comparison with the maps of pea and lentil. *J Herid.* 88: 115-119.

Singh KB. 1990. Prospects of developing new genetic material and breeding methodologies for chickpea improvement. In: Saxena MC, Cubero JI, Wery J (eds) Present status and future prospects of chickpea crop production and improvement in the Mediterranean countries. CIHEAM, Zaragoza, Spain, pp 43–50

Singh KB, Ocampo B. 1993. Interspecific hybridization in annual *Cicer* species. *J Genet Breed* 47:199–204.

Singh KB, Ocampo B. 1997. Exploitation of wild species for yield improvement in chickpea. *Theor Appl Genet* 95:418–423.

Singh KB, Malhorta RS, Halila H, Knights EJ, Verma MM. 1994. Current status and future strategy in breeding chickpea for resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica* 73:137–149.

Singh, K.B., Malhotra, R.S., and Saxena, M.C. 1995. Additional sources of tolerance to cold in cultivated and wild *Cicer* species. *Crop Sci.* 35(5), 1491–1497.

Singh Pramod Kumar, Sharma Himanshu, Srivastava Nidhi, Bhagyawant Sameer S. 2014. Analysis of Genetic Diversity among Wild and Cultivated Chickpea Genotypes Employing ISSR and RAPD Markers. *American Journal of Plant Sciences*, 2014, 5, 676-682. Published Online March 2014 in SciRes. <http://www.scirp.org/journal/ajps> <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.55082>

Singh R, Sharma P, Varshney RK, Sharma SK, Singh NK. 2008. Chickpea Improvement: Role of Wild Species and Genetic Markers. *J Biotechnol Genet Eng Rev* 25: 267-314.

SmyÅkal P, TrněnyÅ O, Brus J, HanaÅček P, Rathore A, Roma RD, Pechanec V, Duchoslav M, Bhattacharyya D, Bariotakis M, Pirintsos S, Berger J & Toker C. 2018. Genetic structure of wild pea (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) populations in the northern part of the Fertile Crescent reflects moderate cross-pollination and strong effect of geographic but not environmental distance. *PLoS ONE* 13(3): e0194056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194056>

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98(3), 503-517.

Sudupak MA, Akkaya MS, Kence A. 2002. Analysis of genetic relationships among perennial and annual *Cicer* species growing in Turkey using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 1220–1228.

Sudupak MA, Akkaya MS, Kence A. 2004. Genetic relationships among perennial and annual *Cicer* species growing in Turkey assessed by AFLP. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 937–944.

Tang, S., Dai, W., Li, M., Zhang, Y., Geng, Y., Wang, L. and Zhong, Y. 2008. Genetic diversity of relictual and endangered plant *Abies ziyuanensis* (Pinaceae) revealed by AFLP and SSR markers. *Genetica* 133(1):21-30.

Tayyar RI, Waines JG. 1996. Genetic relationships among annual species of *Cicer* (Fabaceae) using isozyme variation. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 245–254.

Tesemma T., Bechere E., 1998. Developing elite durum wheat landraces selections (composites) for Ethiopian peas and farm use: Raising productivity while keeping diversity alive. *Euphytica* 102:323-328.

Thompson JD. 2005. *Plant Evolution in the Mediterranean*. Oxford Univ. Press, Oxford.

Tsumura, Y., Ohba, K., & Strauss, S. H. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics*, 92(1), 40-45.

Udupa SM, Robertson LD, Weigand F, Baum M, Hahl G. 1999. Allelic variation at (TAA)*n* microsatellite loci in a world collection of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm. *Mol Gen Genet* 261:354–363

Upadhyaya H.D., Gowda C.L.L., Sastry D.V.S.S.R. 2008. Plant genetic resources management: collection, characterization, conservation and utilization. SAT eJournal 6:1-16.

Upadhyaya H. D., Dwivedi S. L., Ambrose M., Ellis N., Berger J., Smykal P., Debouck D., Duc G., Dumet D., Flavell A., Sharma S. K., Mallikarjuna N., Gowda C. L. L. 2011. Legume genetic resources: management, diversity assessment, and utilization in crop improvement. Euphytica (2011) 180:27–47 DOI 10.1007/s10681-011-0449-3.

Yadav P, Koul KK, Shrivastava N, Mendaki MJ, Bhagyawant SS. 2015. DNA polymorphisms in chickpea accessions as revealed by PCR-based markers. Cell Mol Biol 61: 84-90.

Yildizdogan Zeynep, Ikten Cengiz, Mutlu Nedim, Toker Cengiz. 2016. Genetic relationships among the genera *Cicer* L., *Lathyrus* L., *Lens* Mill., and *Vicia* L., together with similarity of *Lens* taxa based on morphological and AFLP markers. Turk J Bot (2016) 40: 566-575. TÜBİTAK. doi:10.3906/bot-1507-9

Van der Maesen LJG. 1972. *Cicer* L.: a monograph of the genus, with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum* L.), its ecology and cultivation. Wageningen: Mededelingen Landbouwhogeschool.

Van der Maesen LJG. 1987. Origin, history and taxonomy of chickpea. In: Saxena MC, Singh KB, eds. *The chickpea*. Wallingford, UK: CABI, 11–34.

Van Dorrestein, B., Baum, M., & Malhotra, R.S. 1998. Interspecific hybridisation between cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and the wild annual species *C. judaicum* Boiss., *C. pinnatifidum* Jaub. & Sp and *C. bijugum* K.H. Rech. In: 3rd European Conference on Grain Legumes. Opportunities for High Quality, Healthy and Value-Added Crops to Meet European Demands. Valladolid, Spain, November 14–19, 1988, pp. 362–363. European Association for Grain Legume Research, Paris.

Vairinhos F, Murray DR. 1983. The seed protein of chickpea: comparative studies of *Cicer arietinum*, *C. reticulatum* and *C. echinospermum* (Leguminosae). Plant Syst Evol 142:11–22.

Wang G., Mahalingam R., & Knap, H. T. 1998. and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(8), 1086-1096.

Wang N, Hatcher DW, Tyler RT, Toews R, Gawalko EJ. 2010. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Food Res Int 43: 589-594.

Weising K, Kaemmer D, Weigand F, Epplen JT, Kahl G. 1992. Oligonucleotide fingerprinting reveals various probe-dependent levels of informativeness in chickpea (*Cicer arietinum*) Genome 35:236–442.

Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. *Nucleic Acids Research*, **18**, 7213-7218. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/18.24.7213>

Wettberg et al., (2018). Ecology and genomics of an important crop wild relative as a prelude to agricultural innovation. DOI: 10.1038/s41467-018-02867-z. Nature communications.

William, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*, **18**, 6531- 6535. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>

Winter P, Pfaff T, Udupa SM, Hüttel B, Sharma PC, Sahi S, Arreguin-Espinoza R, Weigand F, Muehlbauer FJ, Kahl G. 1999. Characterization and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Mol Gen Genet* 262:90–101

Winter P, Benko AM, Hüttel B, Ratnaparkhe M, Tullu A, Sonnante G, Pfaff T, Tekeoglu M, Santra V, Sant VJ, Rajesh PN, Kahl G, Muehlbauer FJ. 2000. A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* × *C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for fusarium wilt races 4 and 5. *Theor Appl Genet* 101:1155–1163

Wu, K.-s., Jones, R., Danneberger, L., & Scolnik, P. A. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic acids research*, 22(15), 3257-3258.

Wunsch, A., & Hormaza, J. I. 2002. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica*, 125(1), 59-67.

Zeven A.C., 2002. Traditional maintenance breeding of landraces: 2. Practical and theoretical considerations on maintenance of variation of landraces by farmers and gardeners. *Euphytica* 123: 147-158.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183.

Ελληνόγλωσση βιβλιογραφία

Χατζόπουλος Π. 2001. Βιοτεχνολογία φυτών. Εκδόσεις έμβρυο.

Διαδικτυακή βιβλιογραφία

<http://www.iucnredlist.org/details/176608/0>
www.iipr.res.in